



Canaux ioniques, douleur et analgésie - Effets analgésiques du blocage d'ASIC1a par la Psalmotoxine 1

Michel Mazzuca

► To cite this version:

Michel Mazzuca. Canaux ioniques, douleur et analgésie - Effets analgésiques du blocage d'ASIC1a par la Psalmotoxine 1. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Nice Sophia Antipolis, 2007. Français. NNT: . tel-00320033

HAL Id: tel-00320033

<https://theses.hal.science/tel-00320033>

Submitted on 10 Sep 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

T H E S E

pour obtenir le titre de

DOCTEUR en SCIENCES

de l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Spécialité « Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie »

présentée publiquement par

Michel MAZZUCA

Canaux ioniques, douleur et analgésie

Effets analgésiques du blocage d'ASIC1a par la Psalmotoxine 1

Thèse effectuée sous la direction du Dr Florian LESAGE

Soutenue le 21 décembre 2007

Jury :

**Laurent Counillon
Michel De Waard
Joël Nargeot
Eric Lingueglia**

**Professeur
Docteur
Docteur
Docteur**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur**

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Michel Lazdunski qui m'a accueilli dans son laboratoire en 2002 et sans lequel tout ceci n'aurait pu être.

Je garde une pensée très amicale et respectueuse pour Jaques Barhanin, mon parrain de thèse et auprès duquel je viendrai toujours chercher des idées, des bonnes... De la discussion naît la lumière. Merci Jacques !,

Je remercie également avec la même gratitude Florian Lesage qui m'a hébergé et soutenu durant ses dernières années,

Une pensée pour Eric Honoré, un gars du Ch'nord qui connaît le sens du courant...et aussi pour sa compagne, Amanda Patel,

Une autre pour Gérard Lambeau, un chercheur qui a du cœur, et pour sa compagne Christine,

Encore une pour madame le Professeur Anny Cupo, qui m'a permis de débloquer une situation difficile,

Enfin, pour Karim Alloui qui m'a montré quelques bonnes ficelles et aussi pour le Professeur Alain Eschalier dont je salue l'expérience et le sens clinique et que je remercie pour ses conseils.

Les copains,

Guigui, un chercheur exceptionnel, et un homme qui a du cœur, je n'en dirai pas plus...

Manu, « mais pourquoi ça ne marche pas les catécholamines, il faudra essayer la sérotonine... »

Miguel, do you « need cash for ASIC research »?

Marco, un compagnon de paillasse hors-normes

Les copines,

Sylvie, sans toi, rien de tout cela n'existerait, merci pour ton enthousiasme et ta disponibilité

Anne, avec qui les discussions scientifiques sont toujours intéressantes

Inger qui cherche dans le cœur trouve un rein ??

Martine pour ta bonne humeur

Gisèle, même si nous sommes loin, je crois que je peux toujours t'entendre rire !

Et tout ceux à qui je pense sans les nommer, et ils sont nombreux !!!

SOMMAIRE

1	Introduction générale	1
2	Introduction sur la douleur	1
2.1	La nociception	4
2.2	Les douleurs neuropathiques	6
2.3	Douleur inflammatoire et sensibilisation du système sensoriel	8
2.3.1	Douleur aiguë et douleur chronique	8
2.3.1.1	Le site inflammatoire	9
2.3.1.1.1	Les facteurs pro-inflammatoires.	11
2.3.2	L'acidose tissulaire	12
2.4	Canaux ioniques et douleur	14
2.5	Les neurones nocicepteurs	14
2.5.1	Mécanismes périphériques de la nociception	14
2.5.1.1	Les fibres nerveuses afférentes primaires	14
2.5.1.1.1	Les fibres mécanosensibles A α et A β	15
2.5.1.1.2	Les fibres nociceptives A δ et C	16
2.6	Les récepteurs de la douleur	20
2.6.1	La mécanotransduction	20
2.6.2	La thermosensibilité	23
2.6.2.1	Les TRPV	23
2.6.3	Les canaux potassiques à 2 domaines P (K _{2P})	27
2.6.3.1	TREK1 un canal impliqué dans la perception douloureuse polymodale	28
2.6.4	La sensibilité chimique	30
2.6.4.1	La sensibilité au pH	31
2.6.4.2	La sensibilité à l'ATP	32
2.7	La propagation du signal nociceptif	34
2.7.1	Les canaux sodiques dépendants du voltage	34
2.7.1.1	Les canaux sodiques voltage-dépendant sensibles à la TTX	36
2.7.1.2	Les canaux sodiques voltage-dépendant résistants à la TTX	37
2.8	La transmission du signal nociceptif au système nerveux central.	39
2.8.1	Les canaux calciques voltage-dépendants.	39
2.8.1.1	Les canaux calciques de type N	40
2.8.1.2	Les canaux calciques de type P/Q	43
2.8.1.3	Les canaux calciques de type T	43
2.8.1.4	Les canaux de type L	45
2.8.1.5	Les sous-unités auxiliaires $\alpha 2\delta$ -1	46
2.9	Les neurotransmetteurs	46
2.9.1	Introduction	46
2.9.2	Neuropeptides	47
2.9.2.1	La substance P	47
2.9.2.2	Le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP)	48
2.9.2.2.1	Implication du CGRP dans la pathophysiologie de la migraine.	48
2.9.2.3	Le neuropeptide Y	50
2.10	Les voies centrales de la nociception	51
2.10.1	Organisation du thalamus	53
2.10.2	Cortex	54
2.10.2.1	Le cortex somatosensoriel primaire (S1)	55
2.10.2.2	Le cortex somatosensoriel secondaire (S2)	55
2.10.2.3	La composante motivo-affective de la douleur	56
2.10.2.3.1	Le cortex cingulaire antérieur (CCA)	56
2.10.2.3.2	Le cortex insulaire (CI)	56
3	Les canaux sensibles aux protons (Acid Sensing Ion Channels (ASICs))	58
3.1	Introduction	58
3.2	La famille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC	58
3.3	Structure fonction des canaux ASIC	61
3.4	Architecture des canaux ASIC1a	62

3.4.1	Structure du canal ASIC1a	62
3.4.1.1	Strucutre de la sous-unité ASIC1	63
3.5	Structure et mécanismes d'ouverture/fermeture des canaux ASIC	65
3.6	Les courants de type ASIC	67
3.6.1	Les courants de type ASIC en systèmes hétérologues	67
3.6.2	Analogie avec les courants endogènes induits par les protons	69
3.7	Distribution tissulaire	70
3.8	Rôles des canaux ASIC	71
3.8.1	Les souris KO ASIC3	71
3.8.2	Les souris KO ASIC2a	74
3.8.3	Les souris KO ASIC1a	75
3.9	Pharmacologie des canaux ASIC	76
3.9.1	PcTx1, un inhibiteur sélectif de haute affinité d'ASIC1a	77
	Structure de PcTx1	80
3.9.2	Surface d'interaction de PcTx1 avec ASIC1a	81
3.9.3	Implication de PcTx1 dans l'étude des fonctions d'ASIC1a	81
3.10	Régulation de l'activité des canaux ASIC	82
3.10.1	Médiateurs solubles	82
3.10.2	Considérations	83
4	Mécanismes endogènes de contrôle de la douleur et analgésie	85
4.1	Les mécanismes endogènes de contrôle de la douleur	85
4.2	Les mécanismes spinaux	86
4.3	Les mécanismes descendants : les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs	87
4.4	Contrôle des centres supérieurs	89
5	Le système opioïdérique	92
5.1	Historique	92
5.2	Structure générale des opioïdes et classification	93
5.2.1	Récepteurs opioïdes et classification	93
5.2.1.1	Les sous-types de récepteurs des opioïdes	94
5.2.1.1.1	Les récepteurs μ	94
5.2.1.1.2	Les récepteurs δ	95
5.2.1.1.3	Les récepteurs κ	95
5.2.1.2	Distribution des récepteurs des opioïdes	95
5.2.1.2.1	Récepteurs μ (OP3)	96
5.2.1.2.2	Récepteurs δ (OP1)	96
5.2.1.2.3	Récepteurs κ (OP2)	96
5.2.1.3	Fonctions des récepteurs des opioïdes	97
5.2.1.3.1	Récepteurs μ (OP3)	97
5.2.1.3.2	Récepteurs δ (OP1)	98
5.2.1.3.3	Récepteurs κ (OP2)	98
5.2.1.4	Pharmacologie des récepteurs opioïdériques	99
5.2.1.5	Les récepteurs des opioïdes dans la corne dorsale de la moelle épinière	100
5.2.1.6	Mécanismes d'activation croisée des récepteurs opioïdériques	101
5.3	Les opioïdes endogènes	102
5.3.1	Les enképhalines	104
5.3.1.1	Localisations dans le système nerveux central	105
5.3.1.2	Localisations périphériques	106
5.3.1.3	Effets centraux	106
5.3.1.3.1	Effets analgésiques	106
5.3.1.3.2	Autres effets centraux	106
5.3.1.3.3	Effets périphériques	107
5.3.2	La β -endorphine	107
5.3.2.1	Localisations dans le système nerveux central	107
5.3.2.2	Effets centraux	108
5.3.2.3	Effets périphériques	108
5.3.3	Les dynorphines	108
5.3.3.1	Localisations dans le système nerveux central	109
5.3.3.2	Localisations périphériques	109

5.3.3.3	Effets centraux	109
5.3.3.4	Effets périphériques	109
5.3.4	Endomorphines	110
5.3.4.1	Structure et activité	110
5.3.4.2	Distribution	111
5.3.4.3	Effets centraux	112
5.3.4.4	Effets périphériques	112
5.3.4.5	Effets sur l'activité locomotrice	112
5.3.5	Fonctions des neurones opioïdiques	112
5.3.5.1	Action au niveau cellulaire	113
5.3.5.2	Mécanisme d'action central	113
5.3.5.3	Mécanisme d'action spinal	114
5.3.5.4	Mécanisme d'action périphérique	115
5.4	Les peptides anti-opioïdes	116
5.4.1	Généralités	116
5.4.2	Les cholécystokinines (CCK)	119
5.4.3	Le Neuropeptide FF (NPFF)	121
5.4.4	La nociceptine et son récepteur	122
5.4.4.1	Le récepteur ORL1 ("Opioid Receptor-Like 1")	122
5.4.4.2	L'effecteur naturel de la cible orpheline : la nociceptine	122
5.4.4.3	Propriétés de la nociceptine	122
5.4.4.4	Les peptides de la famille du MIF (<i>Melanocyte Inhibiting Factor</i>)	123
6	Article	125
6.1	Introduction	125
6.2	Perspectives	130
7	Annexe	132
7.1	TREK1, a K ⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia (EMBO journal-2004)	133
7.2	Canaux potassiques, maladies héréditaires et acquises (La Revue de Médecine Interne-2007)	134
7.3	Ion channels and epilepsy (Epileptic Disorders-2006)	135
7.4	Membrane Potential-regulated Transcription of the Resting K ⁺ conductance TASK-3 via Calcineurin Pathway (JBC-2006)	136
8	Références bibliographiques	137

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Voies nerveuses sensorielles	5
Figure 2 : Mécanosensibilité	7
Figure 3 : Interactions entre cellules et molécules de l'inflammation et du système nerveux	10
Figure 4 : Relation douleur-pH	12
Figure 5 : Acidose, nocicepteurs et inflammation	13
Figure 6 : Organisation des afférences sensorielles sur les couches laminaires de la corne dorsale	16
Figure 7 : Phénotypes neurochimiques des fibres sensorielles	19
Figure 8 : Modèles de protéines et complexes mécanotransducteurs	22
Figure 9 : Thermosensibilité	24
Figure 10 : Le canal TRPV1	26
Figure 11 : Activation polymodale de TREK1	29
Figure 12 : Courants endogènes du système nerveux induits par les protons	32
Figure 13 : Les canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v)	35
Figure 14 : Mise en évidence du rôle déterminant du type cellulaire dans les effets d'une mutation de $Na_v1.7$.	37
Figure 15 : Topologie des canaux calciques	40
Figure 16 : Les canaux ioniques ASIC	60
Figure 17 : Structure du canal ASIC1 de poulet	63
Figure 18 : Structure de la sous-unité ASIC1 et assemblage trimérique	64
Figure 19 : Hypothèse de l'ouverture des canaux ASIC dépendante du calcium	66
Figure 20 : Courants de type ASIC	68
Figure 21 : Effets de PcTx1 sur les courants ASIC1a et ASIC3	79
Figure 22 : Représentation du squelette de PcTx1	80
Figure 23 : Circuit modulateur spinal opioïdérique provenant du tronc cérébral	88

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Douleur aiguë et douleur chronique	8
Tableau 2 : Précurseurs et séquences des peptides opioïdes endogènes	103
Tableau 3 : Affinité des opioïdes endogènes pour les récepteurs opioïdériques	104

ABREVIATIONS

ACTH :	Adreno CorticoTropic Hormone
AINS :	Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens
AMPc :	Adenosine MonoPhosphate cyclique
AMPA :	alpha-Amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-46propionate
Anktm1 :	ankirin transmembrane domain member 1
ASIC :	Acid Sensing Ion Channel
ATP :	Adenosine TriPhosphate
BDNF :	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BK :	BradyKinine
CCA :	Cortex Cingulaire Antérieur
CCK :	Cholécystokinine
CI :	Cortex Insulaire
CIDN :	Contrôle Inhibiteur Diffus Nociceptif
CGRP :	Calcitonin-Gené Related Peptide
CM :	CentroMédian
DEG :	Dégénérine
DPCPX :	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
FAP :	Fibre Afférente Primaire
IB4 :	Isolectine B4 exogène
ICK :	Inhibitor Cystine Knot
i.c.v. :	Intra-cérébro-ventriculaire
IL-1 :	Interleukine-1
i.t. :	Intra-thécale
MscL :	Mechanosensitive channel of large conductance
MIF :	Melanocyte Inhibiting Factor
MSH :	Melanocyte Stimulating Hormone
NGF :	"Nerve Growth Factor" ou neurotrophine
NMDA :	N-Méthyl-D-Aspartate
NPFF :	Neuropeptide FF
NPSF :	Neuropeptide SF
NO :	Monoxide d'azote
NRM :	<i>Nucleus Raphe Magnus</i>
ORL1 :	Opioid Receptor Like 1
PcTx1 :	Psalmotoxine 1
POMC :	ProOpiomélanoCortine
PG :	ProstaGlandines
SIC :	Stretch Inactivated Channel
SGPA :	Substance Grise PériAqueducal
SNC :	Système Nerveux Central
SP :	Substance P
TEP :	Tomographie par Emission de Positron
TENS :	Stimulation électrique transcutanée à basse intensité
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor- α
TRH :	Thyrotropin-Releasing Hormon
TREK :	TWIK RElated K ⁺ channel
TRP :	Transient Receptor Potential
TTX :	Tétradotoxine
TWIK1 :	Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K⁺ channel
5-HT :	Sérotonine

1 Introduction générale

Véritables modulateurs de l'excitabilité cellulaire, le rôle des canaux ioniques dans la transmission de l'information biologique est capital. Mon travail a consisté en l'étude de l'implication de certains canaux ioniques dans les mécanismes moléculaires de la douleur et de l'épilepsie. J'ai aussi étudié les effets pharmacologiques de différents composés dans des modèles animaux de conditions physiologiques ou pathologiques pour mettre en évidence l'implication de certains canaux ioniques dans les réponses obtenues. À travers ces travaux, nous avons abordé les relations entre canaux ioniques et système opioïdique.

2 Introduction sur la douleur

L'évolution des connaissances sur les bases neurophysiologiques de la douleur rend compte de la complexité du phénomène « douleur ». La douleur est définie comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des dommages tissulaires potentiels ou effectifs, ou décrits en tant que tels par l'association internationale d'étude de la douleur (IASP 2003). Il existe une dichotomie très nette dans le domaine de la douleur. D'excitants progrès ont été obtenus dans la dissection moléculaire des mécanismes cellulaires à l'origine des signaux neuronaux que nous interprétons comme douloureux (Woolf and Salter 2000; Julius and Basbaum 2001). Cependant et malgré ces découvertes, pour de trop nombreux patients, la douleur produit des désagréments qui ruinent et dominent leur vie sociale. Alors qu'en clinique, la douleur a été longtemps négligée par les praticiens et par conséquent peu explorée, la lutte contre la douleur est désormais une priorité. La plupart des traitements actuels n'ont que des effets partiels ou sont à l'origine d'importants effets secondaires indésirables (Sindrup and Jensen 1999). Le besoin clinique indéniable, la souffrance individuelle et le coût socio-économique de la douleur sont donc très importants. L'approche clinique de la douleur pourrait, en fonction des apports de la recherche dans ce domaine, être réévaluée. Un changement de la prise en charge empirique de la douleur vers des stratégies plus ciblées (dans lesquelles les mécanismes précis mis en cause chez un patient seraient spécifiquement inactivés) peut déjà être envisagé. Il est possible, dans une optique

thérapeutique de définir des cibles moléculaires précises pour mettre au point de nouveaux médicaments antalgiques et analgésiques. Au niveau physiopathologique, il s'agit de comprendre les dysfonctionnements des voies de signalisation impliqués sur le plan moléculaire. Sur le plan clinique, on peut retrouver des gènes impliqués dans de nombreux type de maladies héréditaires du système nerveux.

La douleur, comme les autres sensations est une modification de l'activité neuronale, qui est induite par une stimulation produite lors d'un évènement physique ou psychique. Les évènements psychiques ne seront pas considérés ici. Les évènements physiques qui provoquent des sensations douloureuses se produisent généralement au niveau des surfaces épithéliales de l'organisme. C'est au niveau de ces espaces d'échange entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme que sont localisées les extrémités des effecteurs des organes sensoriels. La peau et les muqueuses périorificielles mais aussi le système musculaire, les méninges et les viscères sont pourvus de terminaisons nerveuses nociceptives. Les systèmes nocicepteurs permettent aux organismes pluricellulaires de percevoir des événements extérieurs, mécaniques ou thermiques susceptibles de les endommager. L'inflammation correspond à un état tissulaire particulier, le plus souvent en réponse à des invasions microbiennes bactériennes ou virales, avec ou sans effraction des surfaces d'échange corporelles mais peut également avoir une origine auto-immune ou encore êtres réactionnelles à des lésions tissulaires. Cet état tissulaire génère des signaux nociceptifs eux-même à l'origine de la sensation douloureuse. De plus des lésions physiques, chimiques ou biologiques de chacun des constituants des systèmes neurosensoriels sont également propices aux sensations douloureuses.

La perception douloureuse est par nature désagréable et a un rôle d'alarme. Cependant, la manière dont une sensation douloureuse est ressentie en qualité et en intensité demeure subjective. Ce paradoxe illustre le fait que la sensation de douleur liée à une situation pathologique implique de nombreux stimuli et que sa perception et son intégration sont complexes et segmentées entre de nombreux étages du système nerveux. Ainsi, en termes de douleur, chaque individu est susceptible de réagir différemment en raison de sa propre histoire biologique, notamment en raison des expériences douloureuses déjà vécues. Il est établi que les sensations visuelles, olfactives, gustatives et tactiles sont médiées par des réseaux de neurones

spécialisés et connectés à des cellules sensorielles spécifiques. En est-il de même pour la douleur ?

Un stimulus douloureux est capté en périphérie par les nocicepteurs puis transmis à des neurones spécialisés de la corne dorsale de la moelle épinière et enfin distribués à des régions cérébrales spécifiques dédiées au traitement de l'information douloureuse (Perl 1998). Pour exemple, il est clairement établi que les fibres C et A δ périphériques sont spécifiquement activées par des stimuli nociceptifs (voir 2.4.1.1.2) (Woolf and Costigan 1999) et que la perturbation de leur conduction par des anesthésiques locaux est analgésique (Besson and Chaouch 1987; Millan 1999). De plus, au niveau du relais de la corne dorsale de la moelle épinière, les neurones de la lamina I suivent une relation structure/fonction particulière, répondant spécifiquement soit aux stimuli nocifs (pincements) soit au froid inoffensif en fonction de leur morphologie (Han et al. 1998). Nous savons aujourd'hui que de la stimulation nociceptive jusqu'à la perception, il y a toute une série de mécanismes excitateurs et inhibiteurs augmentant ou réduisant le signal nociceptif, ce qui se traduit par plus ou moins de douleur. Une vision purement linéaire n'est donc pas suffisante pour comprendre la douleur ou pour expliquer comment une douleur peut apparaître ou même persister sans blessure apparente.

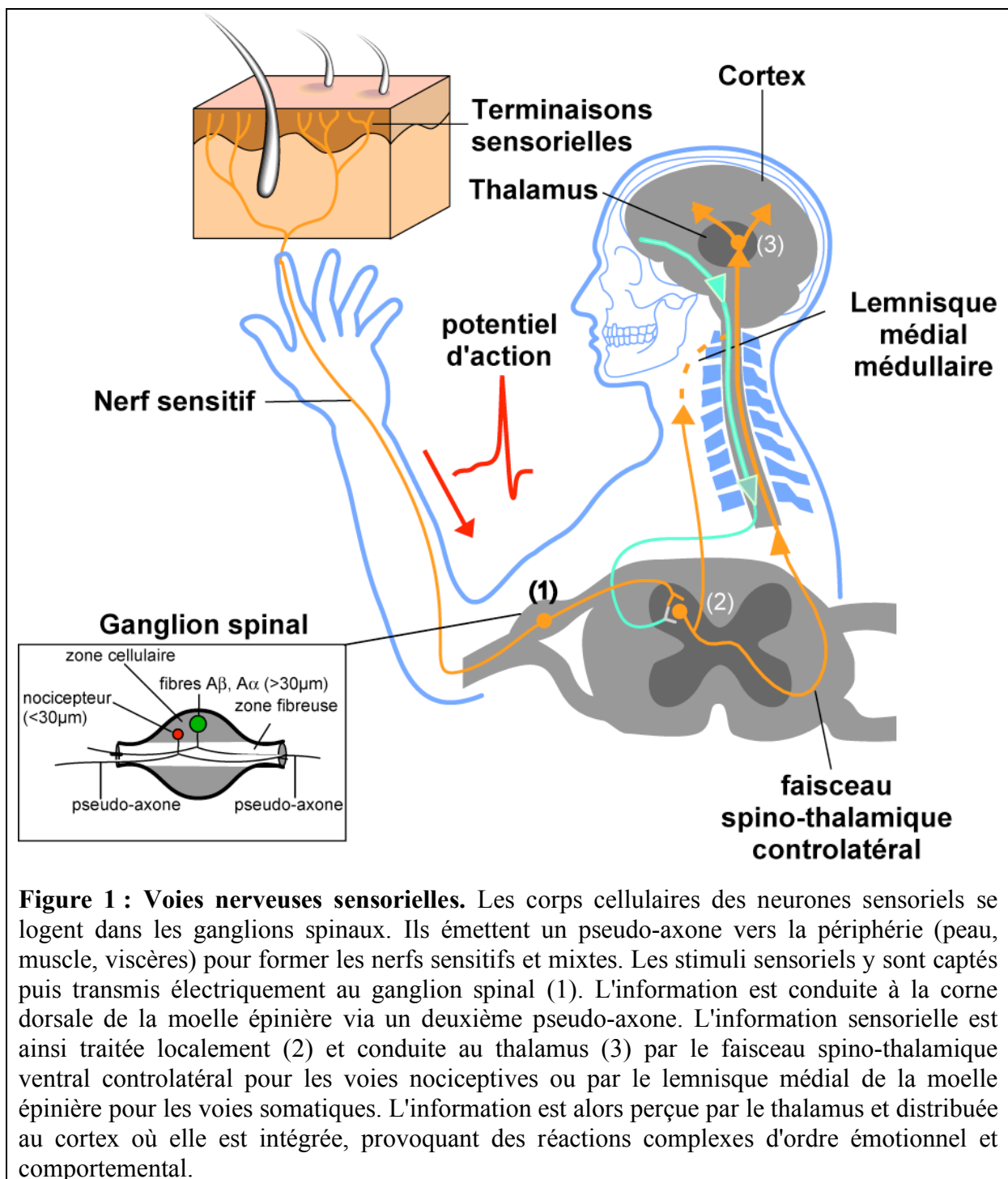
Il existe une hypothèse alternative stipulant que la douleur n'est pas traitée par un système de neurones spécialisés dans la douleur, mais plutôt par une forme spéciale d'activation de neurones également concernés par d'autres informations somatiques (Goldsheider 1894; Wall 1995). En effet, les fibres A β périphériques non nociceptives (voir 2.4.1.1.1) sont impliquées dans la mise en place de la douleur inflammatoire (Neumann et al. 1996). De plus, des observations menées chez des patients présentant des lésions de la moelle épinière révèlent que la perception de la douleur thermique nécessite l'intégrité des voies non nociceptives (Defrin et al. 2002). La réalité semble donc être une situation intermédiaire entre les deux hypothèses : il existe un système nociceptif spécifique pouvant être accompagné de systèmes non nociceptifs et ce au moins dans les premiers relais de la douleur (nerfs, moelle épinière). Afin de mieux comprendre la neurophysiologie de la douleur, il faut donc s'intéresser aux voies afférentes qui conduisent l'influx nociceptif de la périphérie vers les centres supérieurs, tout en portant une attention particulière aux mécanismes endogènes de modulation de la douleur au niveau du système nerveux

central. Ainsi, l'expérience douloureuse est issue de l'interaction entre des processus sériés et parallèles qui s'intègrent dans le système complexe de l'élaboration de la conscience, des émotions et de la mémoire (Perl 1998). Les problèmes abordés dans ce premier chapitre traitent des événements moléculaires et cellulaires de la nociception.

Comme précédemment introduit, plusieurs types de douleurs sont distinguées : (i) la douleur psychogène d'origine somatique sans cause identifiable *sine materia* pouvant inclure des facteurs neuropsychologiques, (ii) la douleur nociceptive due à l'excitation par des facteurs potentiellement dangereux pour l'organisme des nerfs cutanés ou viscéraux, (iii) la douleur neuropathique due à une lésion primaire, un dysfonctionnement ou une perturbation du tissu nerveux, périphérique ou central. Alors que le premier type de douleur ne semble explorable qu'à travers l'imagerie fonctionnelle, les deux autres sont des sujets d'étude particulièrement intéressants tant pour le clinicien que pour le physiologiste. Les douleurs qui seraient en relation avec une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux végétatif ou autonome (dysautonomie) furent à une époque réunies sous le vocable de « sympathalgies » et ne seront abordées qu'annectodiquement.

2.1 La nociception

La nociception peut être divisée en douleur somatique, d'origine cutanée ou des tissus profonds, et douleur viscérale, provenant des organes internes. La nociception survient lorsque les nocicepteurs sont stimulés par des substances relarguées par les tissus endommagés ou inflammés. La combinaison de ces substances appelée « soupe inflammatoire » inclut les protons extracellulaires, les nucléotides, les facteurs de croissance nerveux, la sérotonine, la bradykinine et de nombreux autres composés (Julius and Basbaum 2001). Les terminaisons nociceptives périphériques peuvent également répondre à des stimulations thermiques ou mécaniques (Fig.1). Elles sont généralement limitées dans le temps et sont des indicateurs précis de dommage tissulaire (Suzuki and Dickenson 2000; Julius and Basbaum 2001; Kidd and Urban 2001).

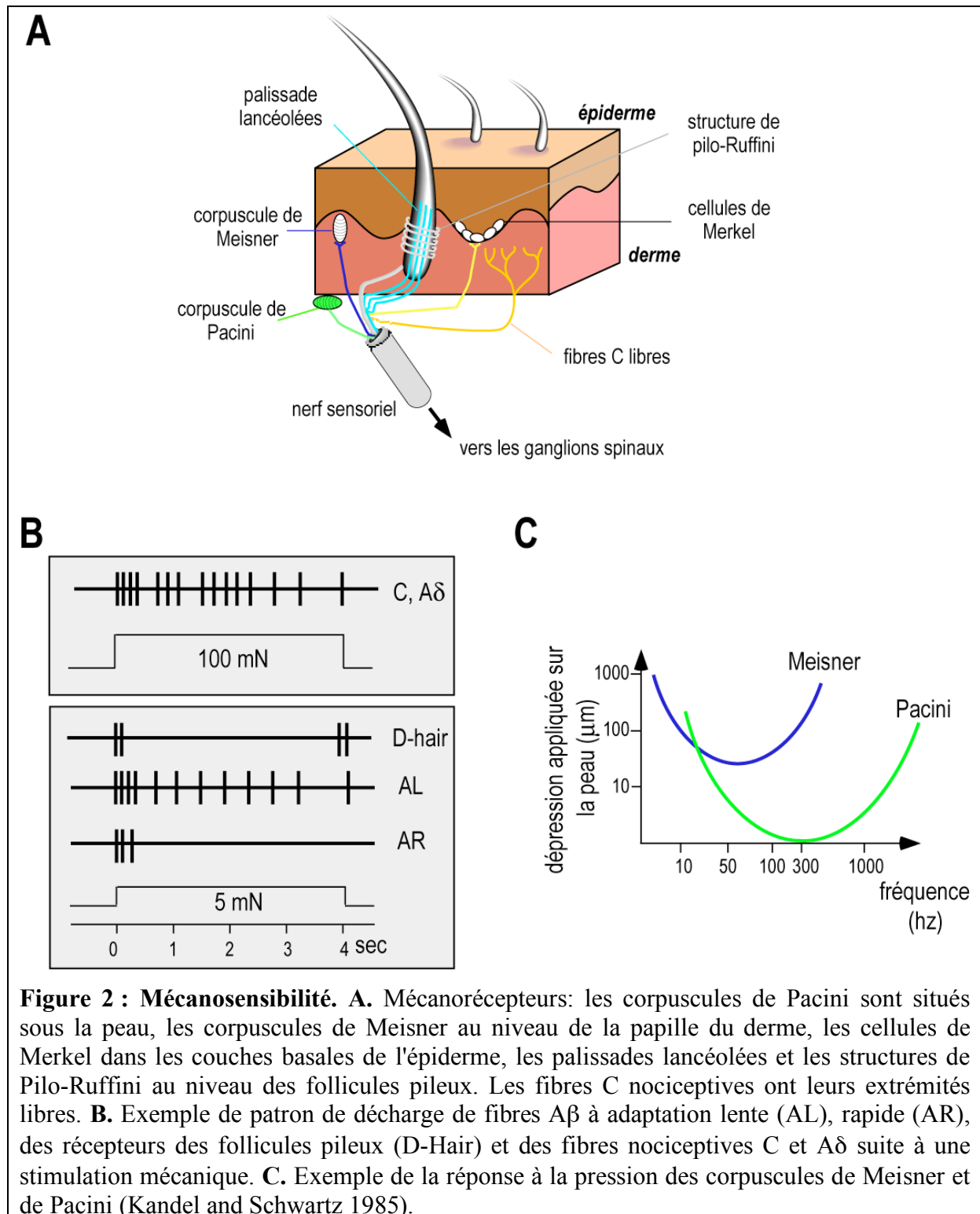


2.2 Les douleurs neuropathiques

1% de la population a connu ou connaîtra une douleur neuropathique. L'adjectif « neuropathique » est la traduction directe de l'anglais « neuropathic ». Ce qualificatif tend à s'imposer, d'autant plus qu'il a été proposé par le comité de taxonomie de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (1986). Celle-ci est liée à l'atteinte lésionnelle ou fonctionnelle du système nerveux. On distingue les douleurs neuropathiques centrales des douleurs neuropathiques périphériques en fonction de la localisation de la lésion ou du dysfonctionnement. Les douleurs neuropathiques périphériques sont dues à des maladies comme par exemple les compressions nerveuses causées par les hernies discales, ou encore sont iatrogènes, causées par les effets secondaires de médicaments, comme c'est le cas avec les alcaloïdes de la pervenche utilisés en cancérologie. Les douleurs neuropathiques centrales sont causées par des dommages spinaux, traumatiques par écrasement ou cérébraux comme c'est le cas pour les lésions thalamo-corticales de certains accidents vasculaires cérébraux. La douleur neuropathique perdure très longtemps après la réparation des dommages tissulaires et devient fréquemment une douleur chronique. Ce type de douleur chronique est particulièrement indésirable et inutile puisqu'elle n'indique plus un dommage corporel et est malheureusement très souvent invalidante. Elle interfère avec la restauration des fonctions normales après une lésion ou une maladie (Suzuki and Dickenson 2000; Julius and Basbaum 2001; Kidd and Urban 2001).

La douleur est perçue et transmise au système nerveux central par les neurones des ganglions spinaux qui peuvent être fonctionnellement divisés en trois groupes d'éléments fonctionnels : (i) les nocicepteurs des terminaisons périphériques qui détectent les stimuli douloureux (mécanosensation, perception thermique et nociception) (Julius and Basbaum 2001; Riedel and Neeck 2001), (ii) les axones qui conduisent le signal nociceptif, (iii) les terminaisons pré-synaptiques qui transmettent le signal au neurone médullaire vers le cerveau où il est interprété comme douloureux (Fig.1). Les corps cellulaires des neurones sensoriels qui innervent la périphérie sont localisés dans les ganglions trigéminalés (pour les perceptions de la tête) et des ganglions rachidiens pour le reste du corps (Julius and Basbaum 2001). Il y a quatre types principaux de neurones sensoriels distingués selon leur

morphologie et de leurs rôles fonctionnels : $A\beta$, $A\alpha$ et $A\delta$ et les fibres C (Snider and McMahon 1998; Sawynok 2003) (Fig. 2).



2.3 Douleur inflammatoire et sensibilisation du système sensoriel

2.3.1 Douleur aiguë et douleur chronique

Il faut distinguer la douleur aiguë, qui reflète la perception d'un ou plusieurs stimuli par le système sensoriel avec sa sensibilité basale, d'une douleur chronique qui accompagne une pathologie inflammatoire ou neuropathique. Dans ce cas, la sensibilité du système sensoriel est exacerbée. Il en résulte des douleurs spontanées (non produite par un stimulus extrinsèque) accompagnées d'hyperalgésie (réponse amplifiée à un stimulus normalement douloureux) et/ou d'allodynie (douleur produite par un stimulus normalement non douloureux) (Tableau 1) (IASP, 2003).

Tableau 1 : Douleur aiguë et douleur chronique (Millan 1999)

	durée	caractéristiques temporelles	caractéristiques majeures	valeur adaptative	réponse adaptative	exemples
aiguë	secondes	simultanée	proportionnelle à la cause	élevée, préventive	retrait, échappement	contact brûlant piqûre
sub-chronique	heures-jours	prend fin avec la convalescence	spontanée, hyperalgésique, allodynique	protectrice	quiéscence, empêcher le contact avec la zone atteinte	inflammation courte
chronique	mois-années	persistente peut durer après la convalescence	spontanée, hyperalgésique, allodynique, paresthésique, dysesthésique, troubles du comportement	mauvaise	neurocognitive	inflammation chronique, arthrite

Cette hypersensibilité du système nerveux sensoriel est le reflet de modifications post-traductionnelles et transcriptionnelles durables résultant de communication entre les systèmes nerveux et immunitaire et le tissu enflammé. Une telle douleur chronique (mois, années) perd sa signification physiologique, à savoir une fonction d'alerte avec l'émergence de réflexes et de comportements de protection qui sont provoqués par les douleurs aiguës (secondes) et subchroniques (heures à semaines), ainsi qu'une fonction efférente modulatrice sur le tissu endommagé. Au niveau comportemental, un état de douleur persistant peut être associé à de l'anhédonie (incapacité de prendre du plaisir à partir d'une expérience normalement plaisante), de l'indifférence vis-à-vis de son environnement ainsi qu'à un état dépressif. La période critique est celle de l'établissement de l'hypersensibilité :

les processus moléculaires précoces responsables de l'établissement et du maintien d'un tel système, des premières heures jusqu'à plusieurs jours, constituent donc une cible thérapeutique importante.

2.3.1.1 Le site inflammatoire

Un foyer inflammatoire peut être initié suite à une lésion tissulaire (blessure, fracture, ischémie, tumeur, situation post-opératoire), à une pathologie auto-immune (arthrite rhumatoïde) ou provoquée par une infection (bactérie). Dans le cas très commun d'une infection, les micro-organismes qui pénètrent la surface épithéliale sont en contact avec les cellules et molécules de l'immunité innée. Les macrophages sont la première ligne de défense : ils sont activés par la liaison à des molécules de surfaces des agents pathogènes. Une fois activés, les macrophages phagocytent ces pathogènes et sécrètent des cytokines, qui vont modifier le comportement des cellules environnantes, et des chémokines qui vont attirer les cellules immunitaires circulantes (neutrophiles puis monocytes). À partir de là, s'installe un système complexe d'interactions entre les cellules immunitaires, les cellules du tissu périphérique et les neurones sensoriels et sympathiques (Fig.3).

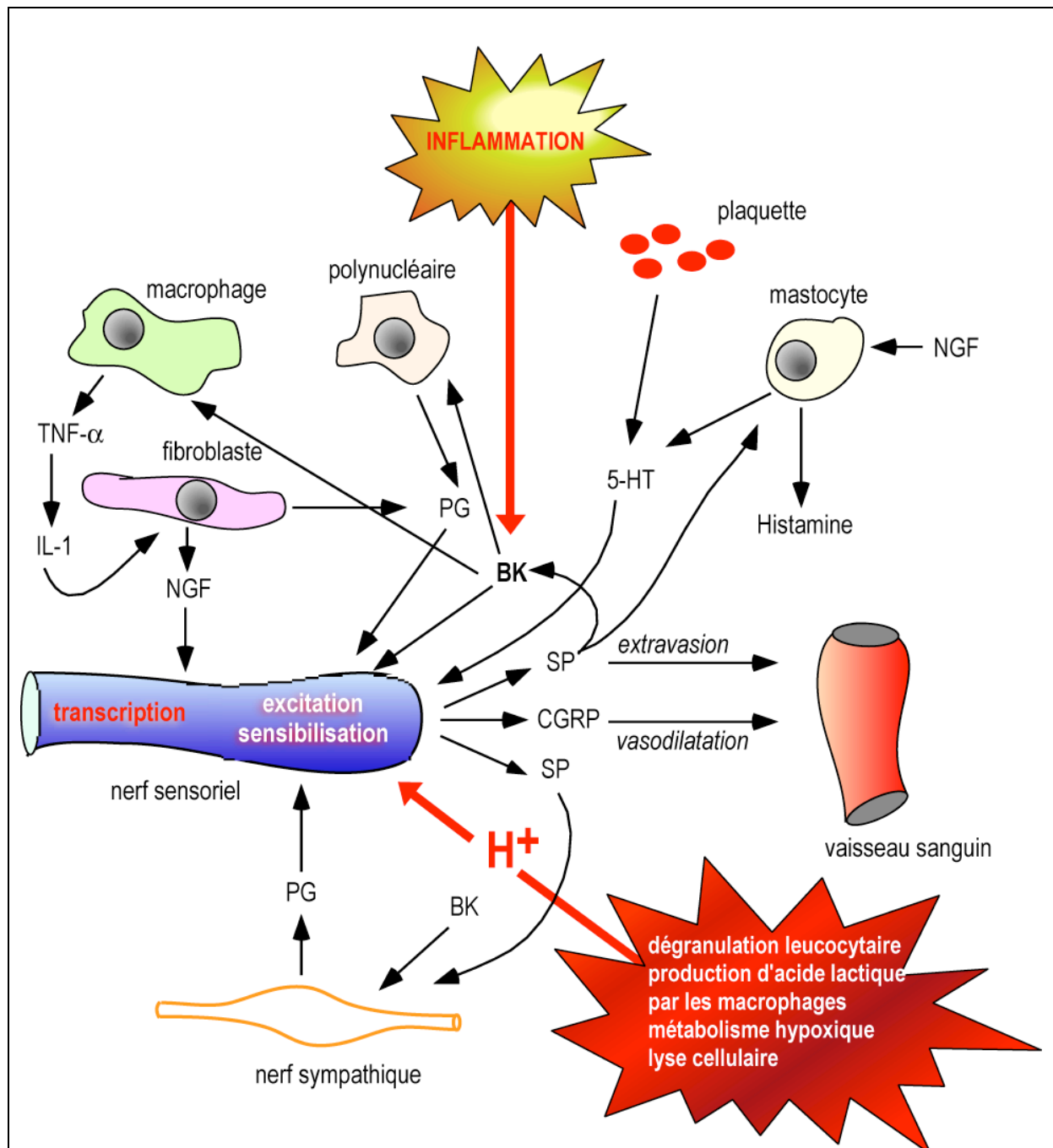


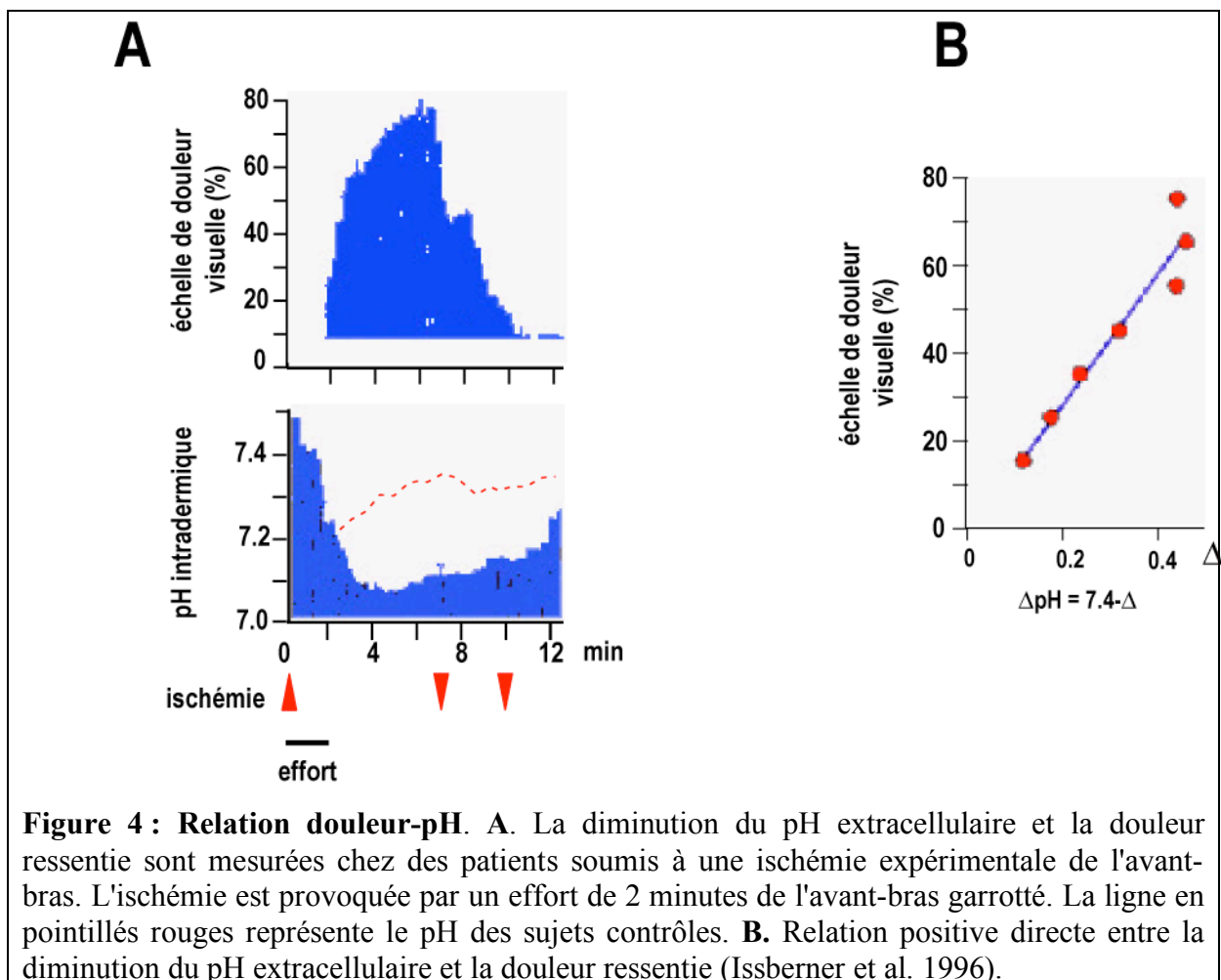
Figure 3 : Interactions entre cellules et molécules de l'inflammation et du système nerveux. Suite à une lésion, la bradykinine est rapidement produite. Elle active directement les neurones sensoriels et stimule la production d'autres facteurs pro-inflammatoires. Parallèlement, le site inflammatoire devient acide, ce qui est une cause importante de douleur. Toutes les interactions entre cellules et molécules de l'inflammation ne sont pas représentées sur cette figure. PG = prostaglandines, BK = bradykinine, SP = substance P, CGRP = "calcitonin-gene related peptide", IL-1 = interleukine-1, NGF = "nerve growth factor", 5-HT = sérotonine, TNF- α = "tumor necrosis factor- α " (Dray and Bevan 1993).

2.3.1.1.1 Les facteurs pro-inflammatoires.

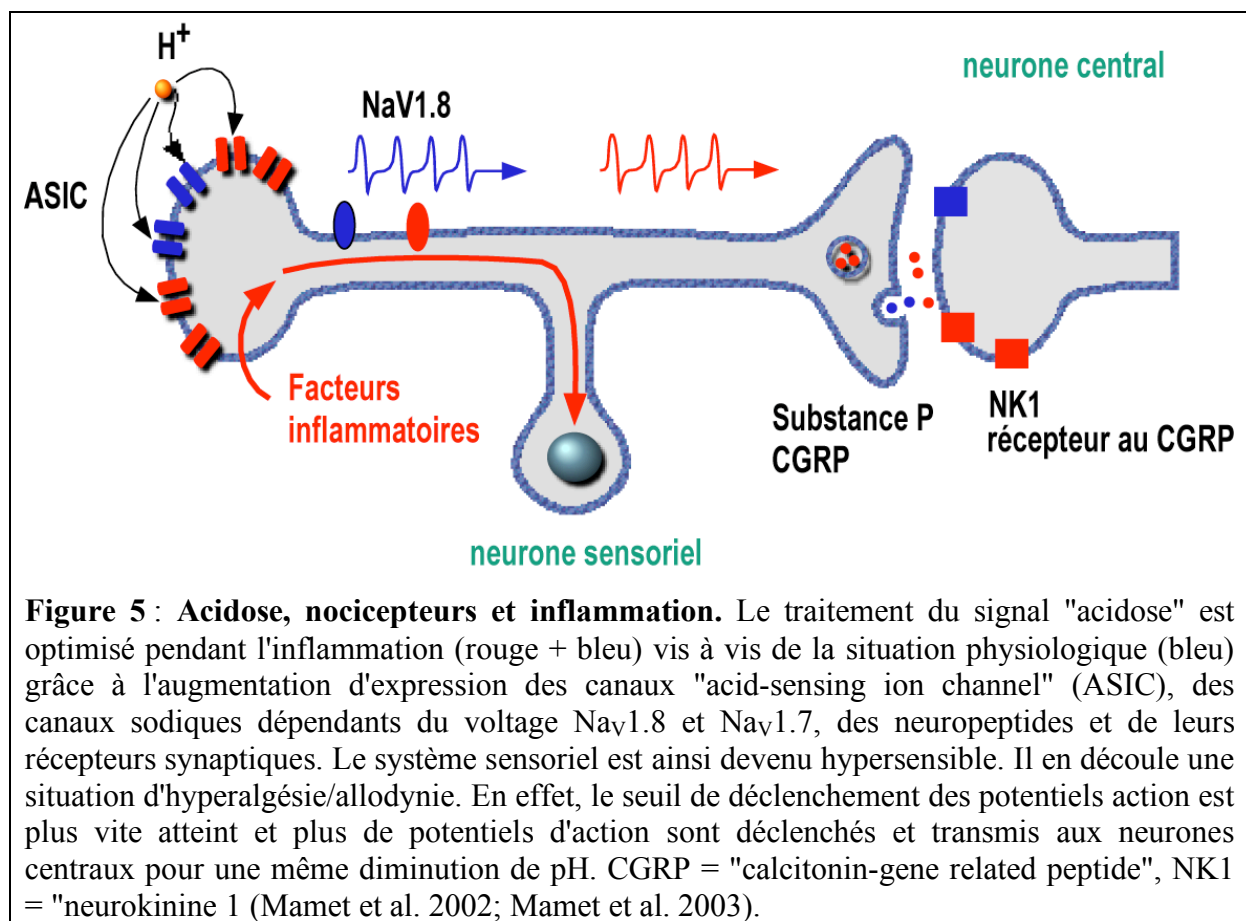
Les facteurs pro-inflammatoires se définissent comme les molécules à l'origine du foyer inflammatoire et de la douleur consécutive. Ce sont des cytokines (interleukine-1 β), des neurotrophines (NGF), des kinines (bradykinine), des prostanoïdes (prostaglandine PGE₂), des leucotriènes (leucotriène B₄), des amines (histamine, sérotonine), ou encore des peptides (substance P, CGRP) et des ions (proton, potassium). Ils facilitent le processus inflammatoire pour la défense de l'organisme. L'extravasation plasmatique dépend de la sécrétion de leucotriène B₄ par les neutrophiles. Cette sécrétion est facilitée par le relargage de CGRP par les neurones sensoriels, et par la production de prostaglandines par les neurones sympathiques. La sécrétion de CGRP est accrue par le NGF, et la production de prostaglandines est elle-même sous contrôle de la bradykinine (peptide algogénique et vasodilatateur) qui apparaît rapidement suite à la catalyse de précurseurs kininogènes par des protéases à sérines kallikréines. Ces enzymes sont issues du plasma ou présentes dans le milieu extracellulaire suite à la dégranulation des mastocytes (Dray and Bevan 1993). Les facteurs pro-inflammatoires génèrent la douleur inflammatoire suite à l'excitation et à la sensibilisation du système nerveux sensoriel. La bradykinine excite les nocicepteurs en liant les récepteurs couplés aux protéines G B₂ constitutif et B₁ induit. En parallèle, elle induit le relargage de sérotonine par les mastocytes, qui avec les prostaglandines PGE₂ et PGI₂ ont une action algogénique propre. En retour, ces dernières sensibilisent le pouvoir algogénique de la bradykinine (Dray 1997). De même, le facteur de croissance nerveux NGF est capable d'induire seul une situation hyperalgésique. Son niveau d'expression augmente au site inflammatoire grâce à l'interleukine-1 β relarguée par les macrophages activés (Lindholm et al. 1987; Lewin and Mendell 1993). Il facilite alors la dégranulation des mastocytes et agit directement sur les neurones pour la production de douleur (Mazurek et al. 1986). Ainsi, ces médiateurs pro-inflammatoires activent les neurones sensoriels et affectent leurs comportements et phénotypes : ce sont des éléments clefs dans l'établissement de la douleur inflammatoire.

2.3.2 L'acidose tissulaire

Les mécanismes décrits ci-dessus constituent la base de l'inflammation et sont à l'origine de la tétrade de Celse décrivant l'inflammation : *calor*, *tumor*, *rubor* et *dolor*. L'intégrité du tissu est altérée au niveau de la lésion : le volume et la pression osmotique changent par lyse cellulaire et extravasion plasmatique puis la température augmente. De même, la composition chimique du milieu extracellulaire change : du monoxyde d'azote (NO) et de l'ATP entre autres sont relargués, et le milieu extracellulaire s'acidifie par la lyse cellulaire, le métabolisme hypoxique, production d'acide lactique par les macrophages et la dégranulation leucocytaire (Fig.3) (Jacobus et al. 1977). Parmi ces paramètres biophysiques et biochimiques qui sont des sources de douleurs, l'acidose tissulaire est cruciale. Chez l'Homme, il a été montré que la douleur provoquée par l'ischémie musculaire est directement corrélée à la diminution du pH extracellulaire (Fig.4) (Issberner et al. 1996).



De plus, la perfusion sous-cutanée de tampons acides chez des sujets sains provoque une sensation de douleur soutenue de type brûlure (Steen and Reeh 1993). Ainsi, les protons sont directement responsables de douleurs non adaptatives importantes. En ce qui concerne l'inflammation, le pH extracellulaire peut atteindre des valeurs aussi basses que pH 5.4 (Jacobus et al. 1977). Au sein d'un site inflammatoire, les protons induisent (i) le relargage de neuropeptides comme le CGRP à l'origine d'extravasation plasmatique et de l'apparition d'oedème (Hua et al. 1995), (ii) une sensation directe de douleur en activant les nocicepteurs (Steen et al. 1992; Steen and Reeh 1993; Steen et al. 1995), (iii) une hyperalgésie mécanique car l'application répétée ou prolongée de sauts de pH sensibilise rapidement les nocicepteurs aux stimuli mécaniques (Steen et al. 1992; Steen and Reeh 1993). Ainsi, les protons sont de puissants acteurs algogéniques au sein du site inflammatoire (Lang et al. 1990; Steen et al. 1995). Les canaux ASIC en sont des récepteurs majeurs, leur biologie est discutée au chapitre 3 (Fig.5).



2.4 Canaux ioniques et douleur

Les canaux ioniques et les récepteurs localisés au niveau des terminaisons nociceptives sont les premiers à détecter les stimuli responsables de la douleur (chaleur, pression, dommage tissulaire, inflammation...) et à transmettre l'information. Parfois, la modulation d'un canal ionique par les constituants de la soupe inflammatoire peut induire un état pathologique comme l'allodynie et l'hyperalgésie. La perception, la transmission, la modulation et l'intégration des informations nociceptives qu'elles soient d'origine neuropathique ou nociceptive débute au niveau des terminaisons nerveuses, elle se poursuit ensuite au niveau des ganglions rachidiens (ou trigéminés) puis au niveau médullaire et enfin au niveau cérébral. À chacun de ces niveaux d'intégration des informations douloureuses, des canaux ioniques et des récepteurs ionotropiques sont activés ou inhibés et permettent à la fois la perception, la transmission et l'intégration de ces signaux.

2.5 Les neurones nocicepteurs

2.5.1 Mécanismes périphériques de la nociception

Le terme nociception fait référence aux conclusions de Sherrington sur les stimuli capables de compromettre l'intégrité de l'organisme. Chez l'animal, ces stimuli sont à l'origine de réponses réflexes (augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire, mydriase) et comportementales (échappement, vocalisation) (Sherrington 1906). Chez l'Homme, ils produisent une réaction considérée comme de la douleur aiguë (Besson and Chaouch 1987), qui est alors le reflet psychologique des réflexes provoqués par la nociception (Sherrington 1906). Aujourd'hui, de manière plus large, le terme de nociception se réfère à la fois aux douleurs aiguës et chroniques.

2.5.1.1 Les fibres nerveuses afférentes primaires

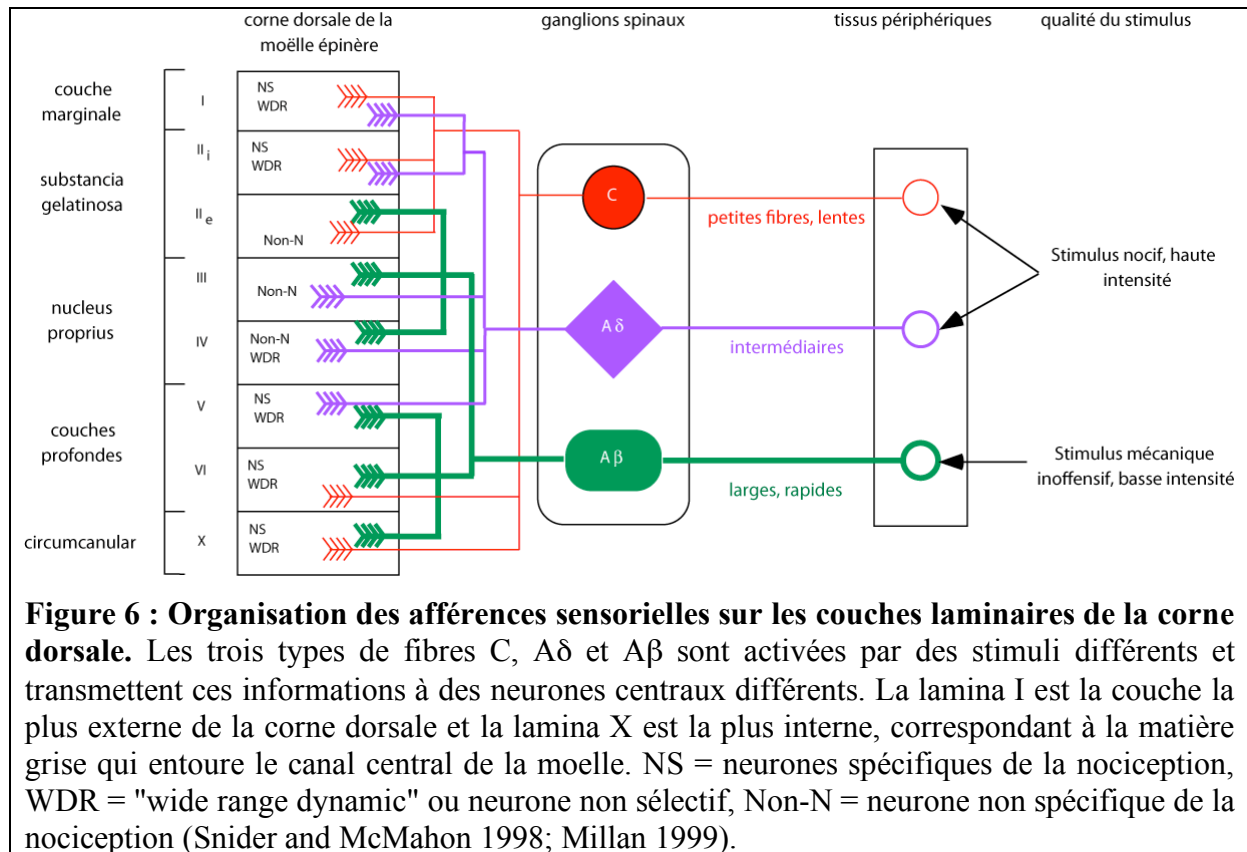
Par souci de clarté, nous ne décrivons que les fibres majoritaires, les fibres cutanées sachant qu'elles partagent des caractéristiques avec les systèmes sensitifs viscéraux et musculaires. Les nerfs sensitifs et mixtes (afférents sensoriels et efférents moteurs) innervent des territoires cutanés appelés dermatomes. Les fibres

sensorielles sont des neurones pseudo-unipolaires dont les corps cellulaires sont logés dans les ganglions spinaux et trigéminaux : un pseudo-axone est émis vers la périphérie et s'assemble avec d'autres pour former les nerfs sensitifs, l'autre vers le système nerveux central, formant la racine postérieure de la corne dorsale de la moelle épinière (ou la racine de la 5^{ème} paire de nerf crânien en amont du ganglion trigéminal) et forment des synapses avec les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Fig.1). Des stimulations de faible intensité activent les fibres A β et A α qui produisent les sensations tactiles. Une sensation de douleur apparaît lorsque les fibres à haut seuil d'activation C et A δ sont activées. Cela se traduit souvent chez l'Homme par une double sensation : une première sensation de piquûre avec une perception topologique due aux fibres A δ suivie d'une sensation plus diffuse de type de brûlure après un délai correspondant à l'activation des fibres C (Lewis 1942; Besson and Chaouch 1987).

2.5.1.1.1 Les fibres mécanosensibles A α et A β

Ce sont des neurones à bas seuil d'activation, de large diamètre (corps cellulaires $\geq 30 \mu\text{m}$, projections $\geq 10 \text{ m}$ chez le rat), myélinisées et donc à conduction rapide (30-100 m/s). Ces fibres représentent 20% des fibres sensorielles cutanées (Millan 1999). En l'absence de lésion, elles répondent uniquement lors d'événements mécaniques non-nociceptifs de faible intensité : toucher, vibration (palesthésie), pression, proprioception (arthrokinésie : perception de la position des membres dans l'espace). Il existe également d'autres fibres à conduction rapide, présentant des caractères communs aux fibres A δ et A β , qui pourraient contribuer à la nociception dans le tissu musculaire (Woolf and Doubell 1994). Sur le plan histologique, leurs terminaisons peuvent former des structures mécanosensorielles avec les follicules pileux au niveau des palissades lancéolées et des structures de Pilo-Ruffini ou encore innervent des structures cellulaires mécanosensorielles cutanées comme les corpuscules de Meisner, de Pacini et de Merkel (Fig.2A) (Reznik 1996). Leurs champs de projections cutanés sont discrets et leurs distributions et diamètres varient avec le type de structure. Les fibres A δ et A β peuvent être classées physiologiquement par rapport à leur vitesse d'adaptation au stimulus, qui peut être rapide lorsqu'elles sont couplées aux corpuscules de Meisner ou lente lorsque les fibres sont couplées aux complexes de Merkel (Fig.2B).

Au niveau médullaire, ces fibres se projettent majoritairement sur les laminae III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière et plus faiblement les laminae II_{externe}/V/VI/X (Fig.6) (Millan 1999). De là, l'information somatique est transmise au cerveau *via* le lemnisque médian.



2.5.1.1.2 Les fibres nociceptives Aδ et C

Chez l'Homme, il existe une bonne corrélation entre le seuil d'activation des fibres nociceptives et le seuil de douleur et entre leur fréquence de décharge et l'intensité de la douleur ressentie (Besson and Chaouch 1987). Pour remplir cette fonction de nocicepteur, les fibres C et Aδ se distinguent en situation physiologique par deux critères : (i) leur seuil d'activation est supérieur à celui des fibres non nociceptives, (ii) elles sont capables de coder l'intensité d'un stimulus nociceptif. Un nocicepteur est donc une cellule capable de distinguer un stimulus nocif, ou potentiellement nocif, d'un stimulus inoffensif (Besson and Chaouch 1987). Les fibres Aδ représentent environ 10% des fibres sensorielles : elles sont de petit diamètre (corps cellulaires < 30 μm, projections de 2-6 μm), finement myélinisées et à vitesse de conduction moyenne (12-30 m/s). Les fibres C sont les fibres majoritaires et

représentent 70% des neurones sensoriels. Elles sont également de faible diamètre (corps cellulaires < 30 μm , projections de 0.4-1.2 μm), mais ne sont pas myélinisées ce qui explique leur vitesse de conduction lente (0.5-2 m/s) (Millan 1999). Les extrémités périphériques de ces fibres sont libres.

Au niveau spinal, les fibres A δ se projettent sur les laminae I, II_{externe}, III, IV, V de la corne dorsale de la moelle épinière et les fibres C sur les laminae I, II, VI et X (Fig.6) (Snider and McMahon 1998; Millan 1999). Sur ces couches, les neurones cibles de la corne dorsale sont soit spécifiques de la nociception, soit non nociceptifs, soit non sélectifs ("wide range dynamic") (Millan 1999).

D'un point de vue physiologique, on distingue de multiples classes de fibres C et ATM. Leur caractérisation est compliquée par de nombreux facteurs incluant des problèmes de variation inter-espèces, entre les différents tissus innervés, entre les méthodes utilisées pour leur détection ainsi que par des problèmes de terminologie.

Néanmoins, la classification physiologique des nocicepteurs en cellules mécanosensibles, thermosensibles et polymodales (sensibles à la fois aux stimuli mécaniques, thermiques et chimiques) est classiquement employée. Vingt pour cent des fibres A δ sont soit polymodales soit mécano-nociceptrices. Au sein des fibres C on distingue également des nocicepteurs thermiques, mécaniques et polymodaux (Besson and Chaouch 1987; Meyer et al. 1994). La différence existant entre une fibre C polymodale et une fibre C spécifique d'un stimulus tient entre autres dans leurs sensibilités respectives. Par rapport aux fibres C polymodales, les fibres C mécanosensibles sont sensibles à des pressions largement inférieures (0.25 mN contre 7.5 mN chez le rat) et les fibres C thermosensibles sont activées à des températures plus basses (< 40°C) (Besson and Chaouch 1987). Ainsi, l'activation d'environ 10% des fibres C nociceptives n'est pas forcément liée à une sensation de douleur (Snider and McMahon 1998). Des divergences existent également au sein d'une même classe de nocicepteurs : certaines fibres C polymodales sont activées dès 40°C alors que d'autres ne répondent qu'à de plus hautes températures (Bessou and Perl 1969). Notons que dans certaines situations, il est possible que des fibres différentes puissent adopter un comportement similaire. Il a ainsi été montré que des fibres A δ mécanosensibles se comportent comme des fibres C polymodales après une stimulation thermique (Campbell et al. 1979). En situation physiologique, les nocicepteurs sont silencieux et des décharges électriques ne sont enregistrées qu'en

présence de stimuli nocifs. C'est le cas des fibres C polymodales : leur activité s'élève rapidement pour une température supraliminaire donnée, puis décroît et se maintient pendant la durée du stimulus. Elle peut dans certains cas perdurer en son absence (Besson and Chaouch 1987). Si l'intensité du stimulus augmente, celle de la réponse des nocicepteurs augmente en fonction des circonstances de manière soit linéaire soit exponentielle (Besson and Chaouch 1987). Lorsque la stimulation est répétée, des comportements opposés peuvent être observés. Les fibres peuvent subir une désensibilisation, ou adaptation, rapide ou lente. Cela a été observé chez les fibres A δ mécanosensibles dont la réponse à un stimulus mécanique intense décroît suite à sa répétition (Lynn and Carpenter 1982) et chez les fibres C polymodales qui ne maintiennent pas leur réponse lorsqu'elles sont stimulées par des facteurs chimiques (capsaïcine) et pro-inflammatoires appliqués individuellement (bradykinine, sérotonine) (Lang et al. 1990; Lynn 1992). À l'opposé, les fibres peuvent être sensibilisées pour le stimulus d'application ou pour d'autres stimuli. Par exemple, les fibres C polymodales sont rarement sensibles au froid avant une stimulation par la chaleur (Bessou and Perl 1969; Torebjork and Hallin 1974). Généralement, la décharge d'une seule fibre nociceptive isolée ne suffit pas à produire une sensation de douleur et l'activation simultanée sur une durée minimum de plusieurs fibres est nécessaire. Cette manière spatio-temporelle de coder l'intensité d'un stimulus s'explique par le fait (i) qu'à chaque neurone cible de la corne dorsale de la moelle épinière correspond un champ de réception cutané impliquant plusieurs fibres nociceptives (Willis 1991), (ii) et que ces neurones cibles ne déclenchent des potentiels d'action qu'après sommation des activités afférentes nociceptives issues de ces champs récepteurs (Millan 1999).

Grâce au développement des connaissances en biologie moléculaire et en biochimie, il est possible de distinguer des sous-groupes au sein des classes de fibres nociceptives en fonction de leurs phénotypes neurochimiques : ainsi les fibres C polymodales se divisent en deux groupes, peptidergiques (exprimant la substance P, voir 2.8.2.1) et non peptidergiques (liant l'isolectine exogène B4) (Fig.7).

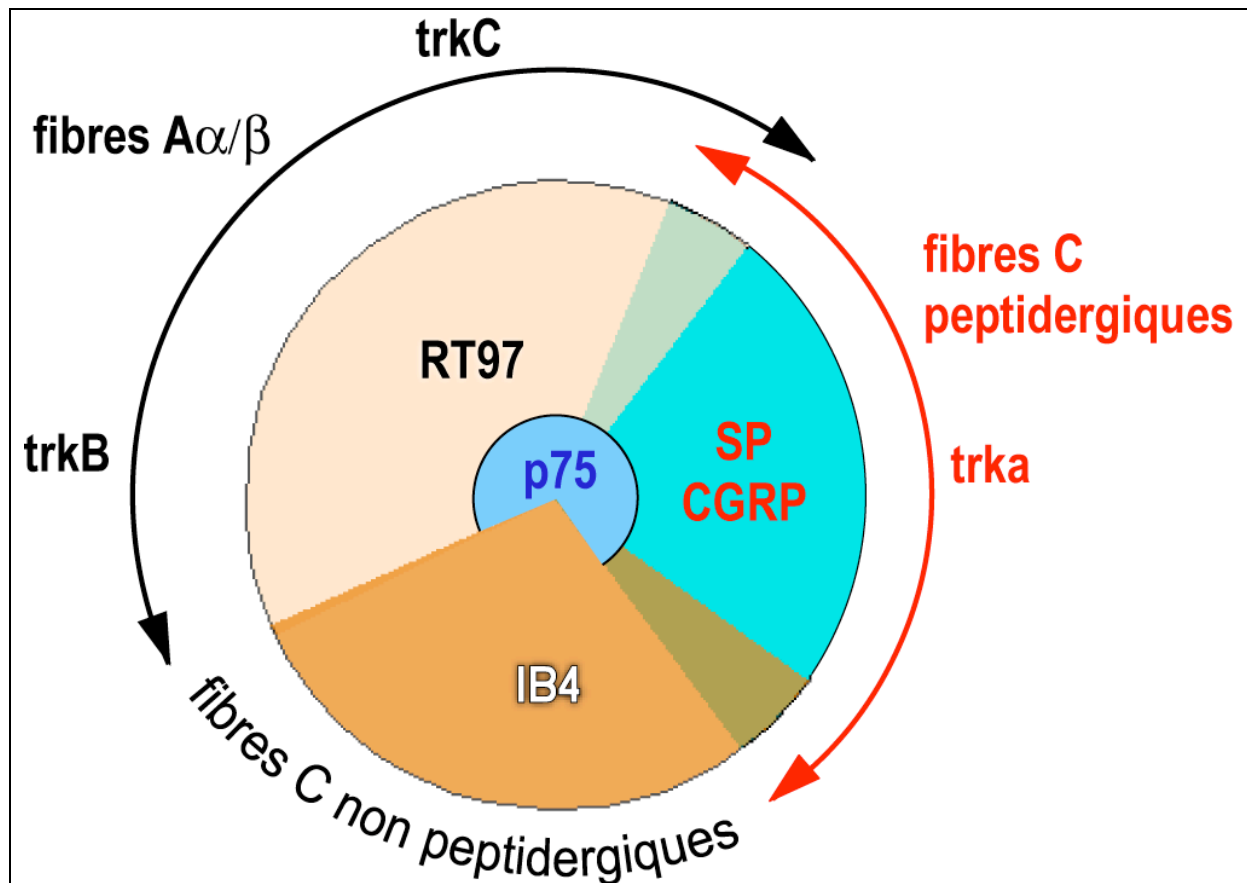


Figure 7 : Phénotypes neurochimiques des fibres sensorielles. Aperçu des principaux marqueurs des fibres C et A β . L'anticorps monoclonal RT97 dirigé contre les neurofilaments de grande taille est spécifique des fibres A α et A β . Les récepteurs aux neurotrophines "brainderived nerve factor" et neurotrophine-3, respectivement trkB et trkC, sont exprimés dans deux sous-populations distinctes de fibres A β . L'isolectine B4 exogène (IB4) lie les fibres C non peptidergiques. Les fibres C peptidergiques expriment les neuropeptides substance P (SP) et "calcitonin-gene related peptide" (CGRP). Concernant les récepteurs qui lient le facteur de croissance nerveux NGF : (i) trkA est majoritairement exprimé par les fibres C peptidergiques, mais il apparaît également dans des sous-populations de fibres C non peptidergiques et A β , (ii) p75, commun aux neurotrophines, est retrouvé dans les cellules qui expriment au moins un récepteur trk (Wright and Snider 1995).

D'un point de vue anatomique, les fibres peptidergiques se projettent principalement sur les laminae I et II_{externe} de la corne dorsale de la moelle épinière, alors que les non-peptidergiques se projettent sur la lamina II_{interne} (Snider and McMahon 1998). Des expériences montrent que la destruction sélective de la lamina I n'affecte pas le niveau de sensibilité basal aux stimuli thermiques et mécaniques, mais abolit l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire (Mantyh et al. 1997). D'autre part altérer l'intégrité des neurones de la lamina II_{interne} abolit la réponse hyperalgésique consécutive aux lésions nerveuses périphériques (Malmberg et al. 1997). Ces résultats

suggèrent donc des différences entre les fonctions nociceptives des fibres C peptidergiques et non peptidergiques vis-à-vis des douleurs inflammatoires et neuropathiques. Les propriétés fonctionnelles d'excitabilité et de communication de chacun des types de fibres dépendent de leur équipement en récepteurs iono- et métabo-tropiques, canaux ioniques dépendants du voltage et neurotransmetteurs.

2.6 Les récepteurs de la douleur

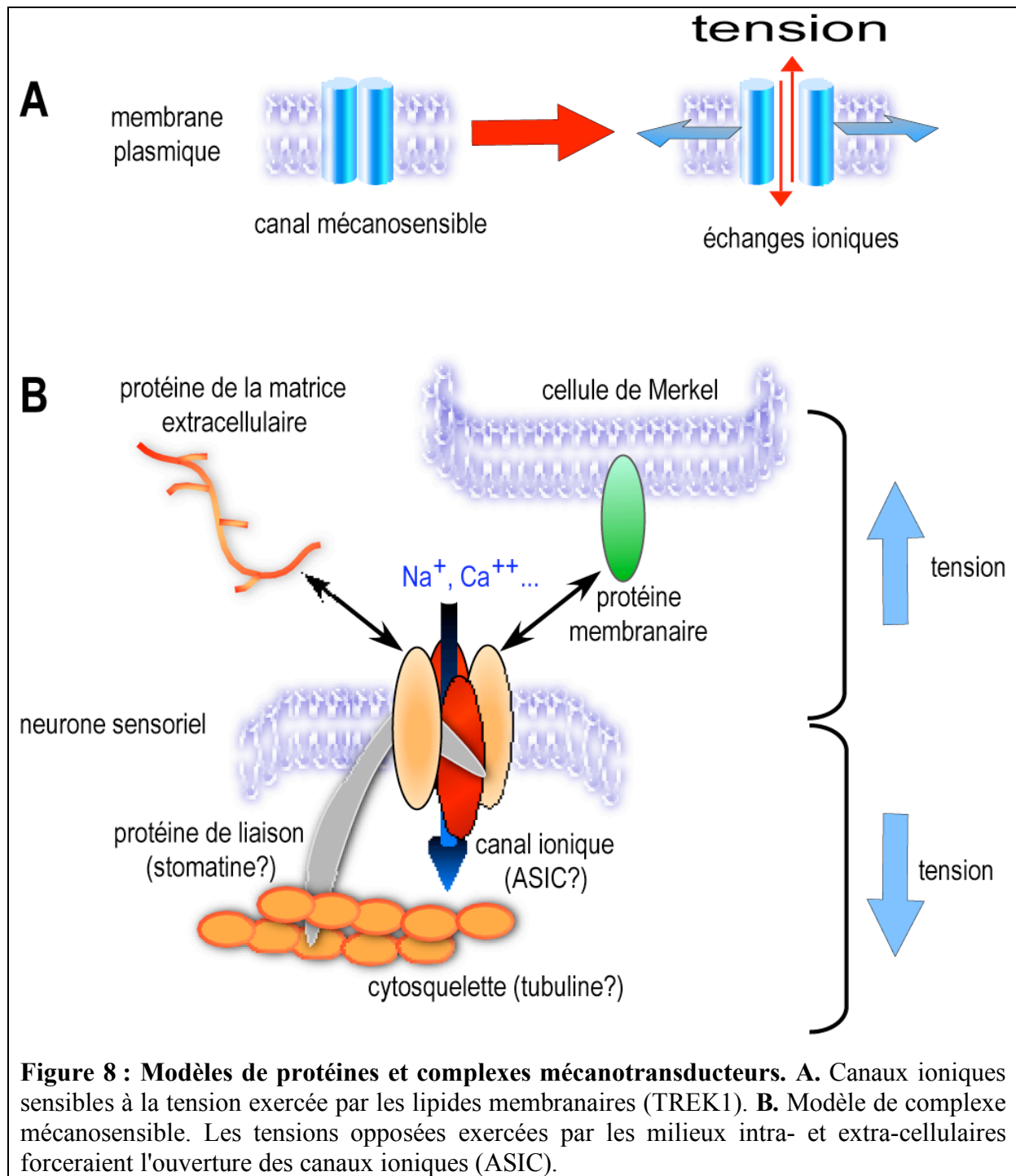
Les extrémités périphériques des nerfs captent les informations sensorielles grâce aux récepteurs qu'elles expriment. Ces récepteurs sont des protéines ou des complexes de protéines capables, directement ou indirectement, de transformer une énergie thermique/mécanique ou une concentration d'effecteurs solubles chimiques en signal électrique qui sera transmis au système nerveux central.

2.6.1 La mécanotransduction

La plupart des neurones sensoriels sont sensibles à une stimulation mécanique. Le premier problème posé est la détermination du site de transduction. La mécanosensibilité est-elle une propriété intrinsèque du neurone ou bien une propriété des complexes mécanorécepteurs liés à leurs extrémités ? Les résultats expérimentaux diffèrent sur la question : des équipes de recherche montrent par exemple que la destruction sélective des cellules de Merkel affecte considérablement la mécanotransduction des fibres A β (Ikeda et al. 1994), alors que d'autres n'observent pas de différences (Diamond et al. 1988). Néanmoins, des arguments vont en faveur de l'idée que certaines fibres sensorielles possèdent une sensibilité mécanique intrinsèque : (i) les extrémités périphériques des fibres C et A δ mécanosensibles et polymodales sont libres, (ii) l'application de pression sur les membranes des neurones sensoriels isolés en culture provoque l'apparition de courants électriques dépolarisants (McCarter et al. 1999). Ces courants sont cationiques non sélectifs et leurs cinétiques et seuils d'activation varient. Ils reflètent ainsi la multiplicité des réponses aux différentes formes de changements de pression par les fibres sensorielles (Fig.2C). Par exemple, les courants enregistrés sur les fibres mécanosensibles à bas seuil d'activation sont larges et activés pour de faibles pressions, alors que ceux des fibres nociceptives sont de moindre intensité et déclenchés uniquement pour de plus hautes pressions. Des différences sont

également observées au sein des sous-populations de nocicepteurs : l'application directe de pression sur les fibres C peptidergiques induit un courant, alors que les fibres C non peptidergiques y sont réfractaires (Drew et al. 2002). L'apparition de ces courants est immédiate suite à la pression exercée sur le neurone, d'où l'idée que les récepteurs mécaniques seraient des canaux ioniques. Le clonage chez la bactérie de canaux ioniques mécanosensibles de la famille "mechanosensitive channel of large conductance" (MscL) en est une preuve. Ces canaux sont activés par des changements de pression osmotique en l'absence de toute autre protéine : ils possèdent une sensibilité intrinsèque à la pression, réagissant aux variations de la courbure membranaire (Martinac et al. 1987; Garcia-Anoveros and Corey 1997). L'utilisation du clonage par expression a permis d'isoler des canaux ioniques et des récepteurs intrinsèquement activés par l'étirement chez les mammifères (Fig.8). Ainsi, le récepteur purinergique P2Y₁ de la famille des récepteurs à l'ATP (voir 2.5.4.2) qui est exprimé par les fibres A β est directement activé par les déformations membranaires (Nakamura and Strittmatter 1996). De même, un canal cationique dépolarisant "stretch inactivated channel" (SIC) apparenté au canal "transient receptor potential vanilloid 1" (TRPV1, voir 2.5.4.1) isolé dans le rein de rat est activé par la réduction du volume cellulaire et inhibé par son augmentation (Suzuki et al. 1999). Ces courants excitateurs peuvent être modulés par d'autres courants, hyperpolarisants et également mécanosensibles supportés par les canaux potassiques à deux domaines P (Alloui et al. 2006) (voir 2.5.3.1). Notons que des canaux chlore hyperpolarisants mécanosensibles ont également été décrits dans les neurones sensoriels (Imai et al. 2000).

Concernant les canaux mécanotransducteurs dépolarisants, l'analyse génétique du nématode *C. elegans* suggère que certains soient des complexes moléculaires transmembranaires. À l'intérieur de la cellule, les canaux seraient liés à des protéines du cytosquelette et à l'extérieur, à des protéines de la matrice extracellulaire ou à des protéines de structures mécanotransductrices (corpuscule de Meissner, palissades lancéolées). Une quinzaine de gènes, appelés *mec*, impliqués dans la biologie des cellules du toucher du nématode *C. elegans* ont été clonés.



Ils codent pour des facteurs de transcription (MEC-3), des protéines de la matrice extracellulaire (MEC-5, une protéine du collagène), du cytosquelette (MEC-12, une tubuline), membranaires (MEC-2, MEC-6 similaire aux paraoxonases) ainsi que pour des canaux ioniques (MEC-4, MEC-10, UNC-105) (Chalfie and Sulston 1981; Chalfie and Au 1989; Driscoll and Chalfie 1991; Huang and Chalfie 1994; Chelur et al. 2002). Un modèle a été proposé suggérant que les variations de pression exercées sur un tissu génèrent des modifications de pression intra- et/ou extra-cellulaire qui sont

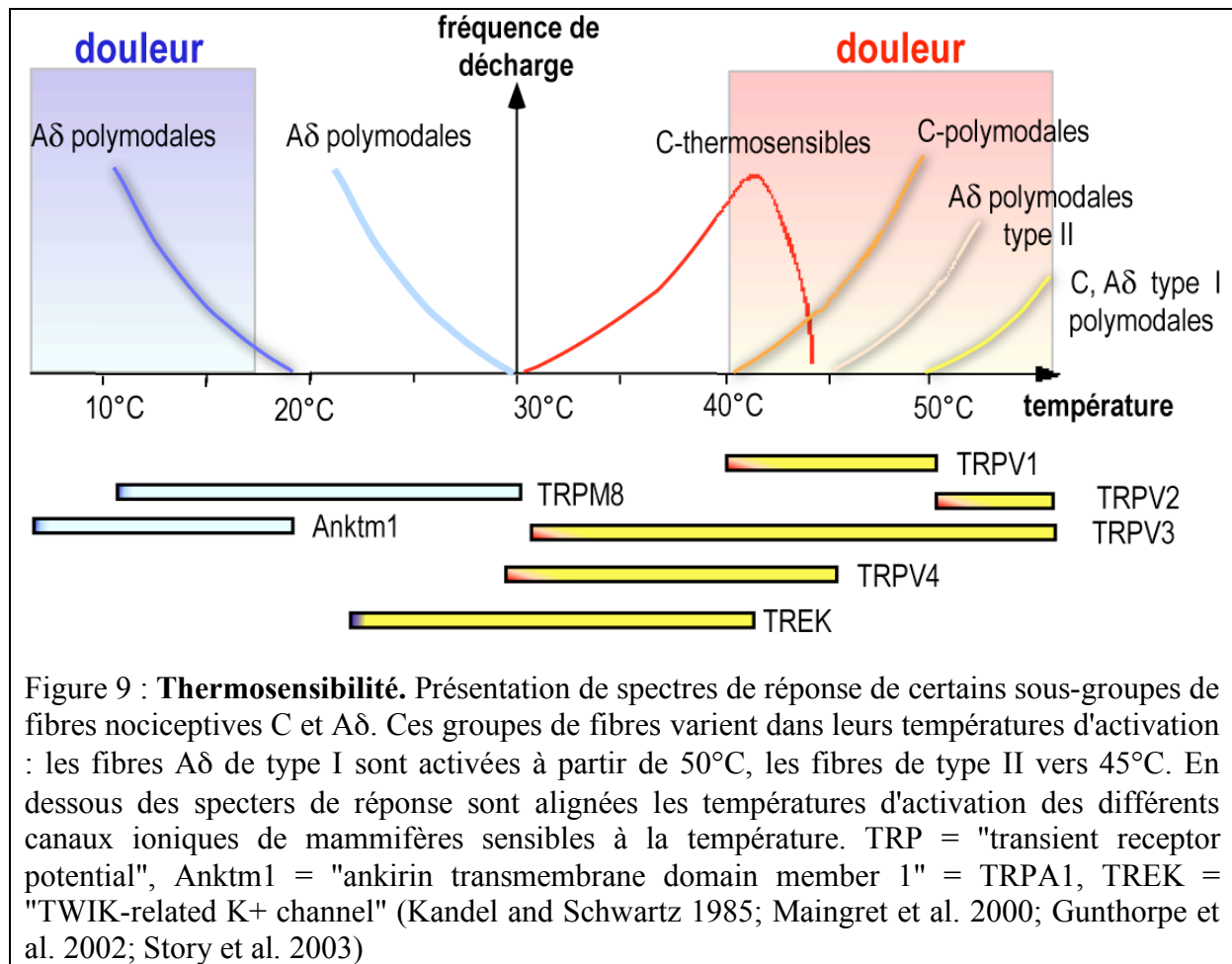
transduites au canal ionique du complexe par ses partenaires intra- et extracellulaires, le forçant ainsi à s'ouvrir (Fig.8B). Les canaux ioniques MEC-4, MEC-10 supposés intégrer un complexe mécanotransducteur dans les cellules du toucher et UNC-105 supposé faire partie d'un même type de complexe dans les récepteurs à l'étirement musculaire sont qualifiées de dégénérines (DEG) (Goodman and Schwarz 2003). En effet, des mutations gain de fonction de ces protéines induisent la mort cellulaire par gonflement en laissant pénétrer des cations en grande quantité dans la cellule (Driscoll and Chalfie 1991). Des canaux ioniques homologues ont été clonés chez les mammifères : les protéines de la famille ENaC/DEG/ASIC (voir 3). Des expériences d'inactivation des gènes codant les récepteurs aux protons "Acid Sensing Ion Channel" ASIC2a et ASIC3 suggèrent que ces canaux ioniques dépolarisants pourraient avoir une fonction dans la mécanotransduction (Price et al. 2000; Chen et al. 2002). Le rôle des canaux ASIC est discuté et approfondi au chapitre 3. Un autre mécanisme tout à fait intéressant est la sensibilité indirecte à la distorsion observée avec le canal ionique P2X3, un membre de la famille des récepteurs à l'ATP (voir 2.5.4.2). L'inactivation du gène qui code pour P2X3 génère un hyporéflexe urinaire (baisse de la fréquence des mictions couplée à une augmentation de la capacité volumétrique de la vessie). Ceci s'explique par le fait que lors du remplissage de la vessie, la pression exercée sur l'urothélium provoque le relargage d'ATP qui est alors perçue par P2X3 exprimé par les fibres sensorielles innervantes (Cockayne et al. 2000). Ainsi, ce champ d'étude a beaucoup progressé depuis les dernières années, mais une vision claire des complexes moléculaires mécanotransducteurs reste encore à établir.

2.6.2 La thermosensibilité

2.6.2.1 Les TRPV

Lorsque la température radiante augmente à proximité de la peau, une sensation de douleur apparaît vers 43°C et s'intensifie si la température continue d'augmenter (LaMotte and Campbell 1978). À l'inverse, une sensation de froid apparaît en dessous de 30°C et devient douloureuse en dessous de 10-15°C (Chen et al. 1996). Les fibres nociceptives sont activées *in vivo* par de telles températures nocives. De même, les neurones sensoriels en culture déclenchent des courants

électriques lorsqu'ils sont soumis à ce froid (Fig.9), suggérant l'existence de canaux ioniques thermosensibles.

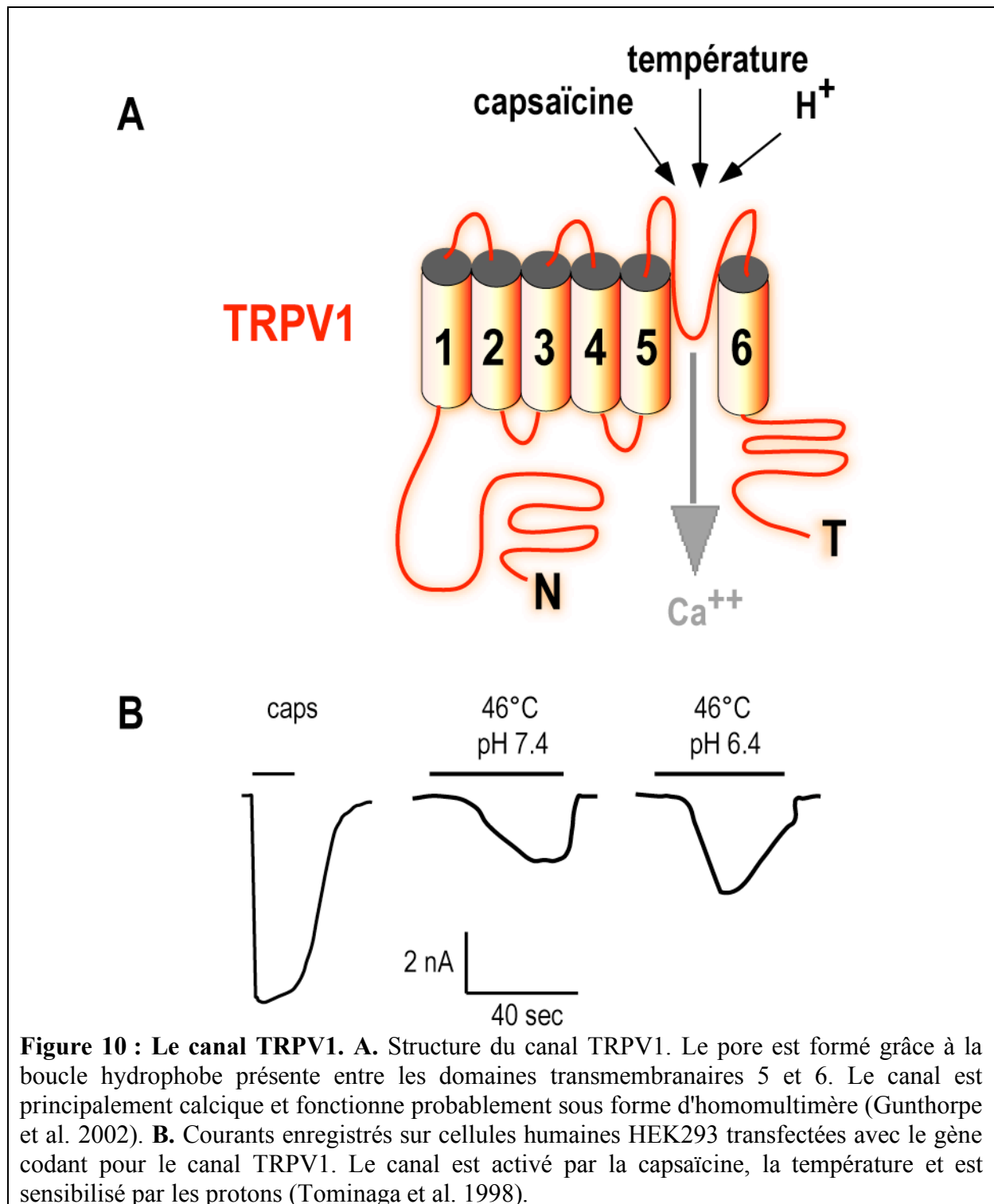


Il a été montré *in vivo* que la capsaïcine (composé vanilloïde, principe actif des poivres de la famille capsicum) produit une sensation de chaleur et de douleur (Szolcsanyi et al. 1993), et que *in vitro* elle dépolarise les nocicepteurs et accroît leur concentration en calcium cytosolique libre (Dray et al. 1990). Ces propriétés ont permis à Caterina et à ses collaborateurs de cloner un canal activé par la chaleur : le canal ionique récepteur de la capsaïcine, TRPV1, exprimé par les fibres C peptidergiques et non-peptidergiques (Caterina et al. 1997) (Fig.10). TRPV1 appartient à la famille des canaux ioniques "transient receptor potential" (TRP). Un canal fonctionnel est un multimère, chaque monomère formé de 838 acides aminés qui comprennent 6 domaines transmembranaires et un domaine hydrophobe entre les domaines 5 et 6 pour la formation du pore (Gunthorpe et al. 2002).

La superfamille des TRP contient plus de 20 membres. Elle regroupe des canaux cationiques qui jouent un rôle critique dans une gamme étendue de fonctions allant de la physiologie sensorielle à la vasorelaxation et la fertilité masculine.

Exprimé en système hétérologue (lignée cellulaire, ovocyte de Xénope) et en l'absence de capsaïcine, TRPV1 génère à partir de 42°C un courant entrant cationique non sélectif à préférence calcique ($P_{\text{calcium}}/P_{\text{Na}^+} \sim 9$) similaire au courant endogène thermosensible. L'intensité de ce courant augmente avec la température en dessous de 50°C (Cesare and McNaughton 1996; Caterina et al. 1997). Les souris invalidées pour le gène qui code TRPV1 présentent une diminution de la thermosensibilité à partir de 43°C et qui s'accroît vers 50°C. Cela se traduit par une diminution à la fois des courants induits par ces températures sur les neurones en culture et de la fréquence des décharges de potentiels d'action des fibres C en explant nerf/peau. Une diminution de l'hyperalgésie thermique induite par l'inflammation est également observée (Caterina et al. 2000).

TRPV1 est donc un canal impliqué dans la thermo-nociception, mais il n'est pas seul responsable de cette fonction car (i) l'hyperalgésie thermique neuropathique reste intacte chez les souris invalidées pour le gène codant TRPV1 (Caterina et al. 2000), (ii) une étude menée sur neurones sensoriels en culture indique qu'il peut exister un découplage entre les réponses maximales à la capsaïcine et à la chaleur alors que les courants induits sont similaires (Vyklíček et al. 1999), (iii) certains neurones sensoriels sont sensibles à la capsaïcine et insensibles à la chaleur (Vyklíček et al. 1999). Par ailleurs TRPV1 semble impliqué dans d'autres types de douleurs. Ce canal activé par la chaleur et la capsaïcine est potentialisé par certains médiateurs de l'inflammation, l'ATP, le NGF, la bradykinine à travers l'activation des récepteurs P2Y2 et B2, au niveau des ganglions spinaux (Tominaga et al. 2001; Sugiura et al. 2002; Tominaga and Caterina 2004). L'expression de TRPV1 est positivement régulée dans des conditions inflammatoires, à ce titre, il est considéré comme un intégrateur de la douleur inflammatoire. Chez l'Homme, des modifications de l'expression de TRPV1 ont été rapportées au niveau de l'inflammation intestinale dans le syndrome du côlon irritable (Cortright and Szallasi 2004). L'observation que l'activation d'une seule entité moléculaire induise une réponse nociceptive lors de stimulations physiques et chimiques aussi diversifiées est un argument en faveur d'une organisation unitaire des voies de signalisation de la douleur.



La sensibilité aux autres gammes de températures semble également être due par des canaux ioniques de la famille TRP : (i) TRPV2, exprimé par les fibres de moyens et larges diamètres est activé à partir de 52°C (Caterina and Julius 1999), (ii) TRPV4 est sensible à des températures au dessus de 25°C, TRPV3 de 31°C. En outre, ils sont exprimés par les kératinocytes, suggérant une collaboration entre les fibres sensorielles et les cellules de l'épiderme *via* le relargage de messagers extracellulaires (ATP, voir 2.5.4.2) pour la perception des températures tièdes (Chung et al. 2003), (iii) les canaux ioniques TRPM8 sensibles au menthol et TRPA1 (Anktm1) sont exprimés dans des populations différentes de neurones sensoriels et sont activés pour des températures en dessous de 18°C (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002). Ce canal activé à la fois par le menthol et le froid pourrait expliquer au niveau moléculaire pourquoi des sensations similaires peuvent être ressenties lors de stimulations différentes (Peier et al. 2002; Story et al. 2003). Ainsi, TRPV2, TRPM8, deux autres membres des canaux thermosensibles, en plus de TRPV1, ont des seuils d'activation proches des gammes de températures nocives pour l'organisme suggérant qu'ils pourraient être également impliqués dans la nociception thermique (Tominaga et al. 2001). De même que pour la mécanosensation, il existe des canaux potassiques sensibles à la température (Maingret et al. 2000).

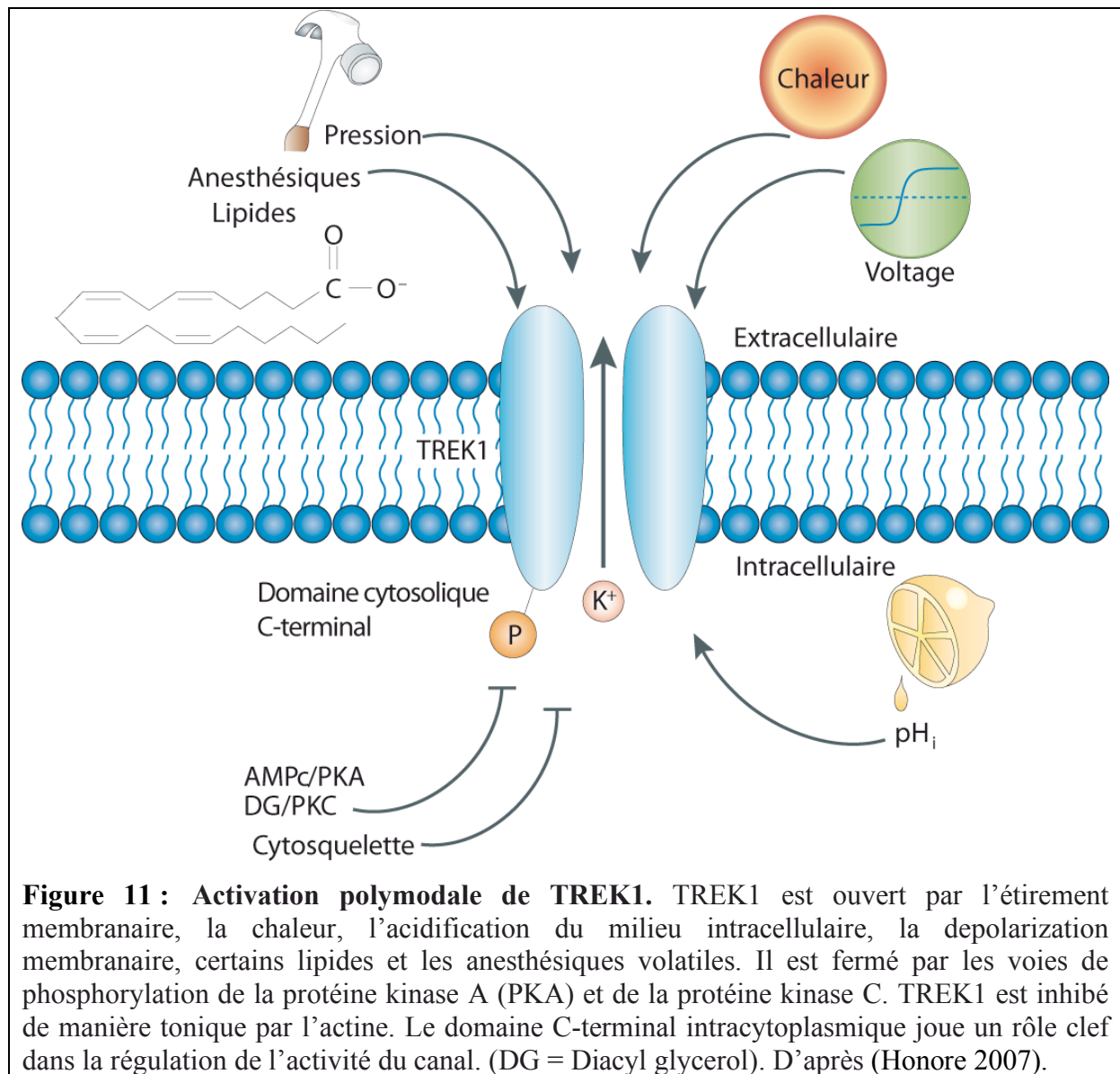
2.6.3 Les canaux potassiques à 2 domaines P (K_{2P})

Comme nous l'avons évoqué, certains canaux potassiques, les K_{2P}, et en particulier le canal TREK1, sont impliqués dans les phénomènes de perception douloureuse. Ces canaux potassiques dits de fond sont des pores ioniques transmembranaires sélectifs au potassium constitutivement ouverts au repos et jouant des fonctions centrales dans le contrôle de l'excitabilité neuronale. Au repos, ces canaux régulent le potentiel membranaire à un niveau proche du potentiel d'équilibre du potassium autour de -90mV (-50 à -60mV dans les neurones sensoriels de ganglion spinal) et par conséquent ils réduisent l'hyperexcitabilité. Ces canaux potassiques de fond ont un rôle majeur dans la régulation du potentiel de repos membranaire, de la durée des potentiels d'action, de la résistance membranaire et du relargage de neurotransmetteurs (Castellucci and Kandel 1976; Siegelbaum et al. 1982; Franks and Lieb 1988), pour revue voir Honoré (Honoré 2007).

Les canaux K_{2P} sont composés de sous-unités qui s'assemblent sous forme de dimère pour former un canal fonctionnel. La sélectivité pour le potassium est très importante ($(P_{Na}/P_K) < 0.03$). La première sous-unité mise en évidence est le canal TWIK1 pour Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K^+ channel. Au total, 15 gènes codant des sous-unités de ces canaux ont été découverts.

2.6.3.1 TREK1 un canal impliqué dans la perception douloureuse polymodale

Nous traiterons ici de l'implication du canal TREK1 (Twik **RE**lated **K**⁺ channel) dans la perception douloureuse. Le canal TREK1 a été le plus étudié des K_{2P} et présente des propriétés pharmacologiques particulières. En effet, il est modulé par les lipides et les anesthésiques généraux volatiles. Nous avons étudié son implication dans l'épileptogénèse chez la souris et nous avons également mis en évidence son implication dans l'effet antiépileptogène des acides gras polyinsaturés chez la souris (Heurteaux et al. 2004) (voir Annexe). Nous avons également obtenu un financement pour un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) interrégional visant à rechercher des mutations du gène ce canal et d'autres K_{2P} dans des épilepsies idiopathiques chez l'Homme. Le canal TREK1 est activé par la stimulation mécanique, l'acidose intracellulaire et la température (Fink et al. 1996; Patel et al. 1998; Honore et al. 2002; Kang et al. 2005). TREK1 est colocalisé avec le canal TRPV1 à la fois dans les neurones de petit et de moyen diamètre des ganglions spinaux de souris (Maingret et al. 2000; Talley et al. 2001; Alloui et al. 2006). TREK1 est ouvert par des stimuli nociceptif comme la pression et la chaleur (Patel et al. 1998; Maingret et al. 2000; Honore et al. 2006) (Fig 11).



Les souris invalidées pour le gène TREK1, sont plus sensibles que les souris sauvages à des stimulations thermiques douloureuses. Le seuil d'activation du canal aux stimulations thermiques est intermédiaire sur les températures non douloureuses et la température induisant une stimulation nociceptive (Alloui et al. 2006). De plus des expériences sur fibre C polymodale isolée mettent en évidence que les neurones de ganglion spinal des souris TREK1^{-/-} ont une sensibilité augmentée pour des stimulations thermiques entre 30° et 45°C (Alloui et al. 2006). Aucune différence entre les souris sauvages et les souris TREK1^{-/-} n'a été observée pour la sensibilité au froid. La sensibilité à la pression des souris TREK1^{-/-} est également augmentée dans le test de von Frey. Ainsi la déletion de TREK1 induit une allodynie et suggère que les canaux K_{2P} jouent un rôle important dans la régulation

de la sensibilité mécanosensible. La douleur chronique implique une sensibilisation des nocicepteurs et des récepteurs thermiques par les médiateurs de l'inflammation. De façon étonnante, l'hyperalgésie thermique et mécanique après inflammation est plus importante chez les souris TREK1^{-/-}, ce qui exclue les canaux TREK1 dans la sensibilisation au cours de l'inflammation (Alloui et al. 2006).

Les neurones des ganglions spinaux expriment, comme nous l'avons exposé plus haut, de nombreux canaux TRP permettant de percevoir les variations thermiques (Clapham 2003; Nilius et al. 2007). Par exemple, TRPV3 et TRPV4 sont sensibles aux températures de plus de 30°C et TRPV1 pour les températures au delà de 43°C. Le ratio de réactivité pour une élévation de 10°C (Q_{10}) de TRPV1 est estimé à 10-20 alors que celui de TREK1 est de 5–7 (Maingret et al. 2000; Kang et al. 2005). Cette observation suggère que TREK1, bien que moins sensible que TRPV1 aux variations thermiques, module l'excitabilité des nocicepteurs probablement en s'opposant à la dépolarisation des TRP et pourrait ainsi participer à la perception de petites variations thermiques (Seydel 2002). Compte-tenu de ces différentes observations, le canal TREK1 et les autres membres de la famille des K_{2P} qui n'ont pas encore été étudiés dans le domaine de la douleur semblent être des cibles thérapeutiques non négligeables. Cependant aucune mutation d'un K_{2P} n'a encore pu être mise en évidence chez l'Homme (Mazzuca and Lesage 2007) (voir Annexe).

2.6.4 La sensibilité chimique

Une sensation de douleur peut être produite par diverses classes de molécules chimiques, soit exogènes comme nous l'avons déjà évoqué avec la capsaïcine, soit endogènes (H^+ , ATP, bradykinine, sérotonine) et produites au cours de processus pathologiques (inflammation, neuropathie, cancer). Généralement, leur perception s'effectue *via* la liaison à un récepteur, mais dans le cas d'un agent lipophile, il peut agir en altérant les propriétés biophysiques de la membrane plasmique (éthanol). Les protons et l'ATP sont parmi les substances les plus algogéniques (sources de douleur).

2.6.4.1 La sensibilité au pH

Les protons sont de puissants excitateurs des nocicepteurs : en effet, la perfusion sous-cutanée de tampons acides excite ces neurones de manière non adaptative et génère de la douleur (Steen and Reeh 1993). Des études d'explants nerfs/peau menées chez le rat révèlent deux types de réponses aux protons en fonction du type de fibres : (i) un groupe de fibres C et A δ génère des décharges irrégulières et à basse fréquence, (ii) un groupe de fibres C polymodales génère des décharges reproductibles, non adaptatives et proportionnelles à la diminution du pH extracellulaire (Steen et al. 1992). Dans cette situation, les seuils d'activation des fibres sont compris entre pH 6.9 et pH 6.1, avec une fréquence maximale de décharges pour pH 5.2 (Steen et al. 1992). Mis en culture, les neurones sensoriels génèrent plusieurs types de courants en réponse aux protons : (i) un courant sodique à activation/inactivation rapide, (ii) un courant biphasique avec une composante soutenue cationique non sélective, (iii) un courant cationique non sélectif à activation/inactivation lente (Fig.12) (Krishtal and Pidoplichko 1981b; Bevan and Yeats 1991). Ces courants apparaissent dans environ la moitié des neurones sensoriels et varient dans leurs seuils de déclenchement, sélectivités ioniques et cinétiques d'activation/inactivation (Krishtal and Pidoplichko 1981b; Bevan and Yeats 1991; Benson et al. 1999). Les protons agissent au niveau moléculaire sur deux types de récepteurs, activant directement les canaux ASIC et sensibilisant le canal TRPV1. Les canaux ASIC, dont les courants sont similaires aux courants endogènes rapides induits par les protons, sont décrits au chapitre 3.

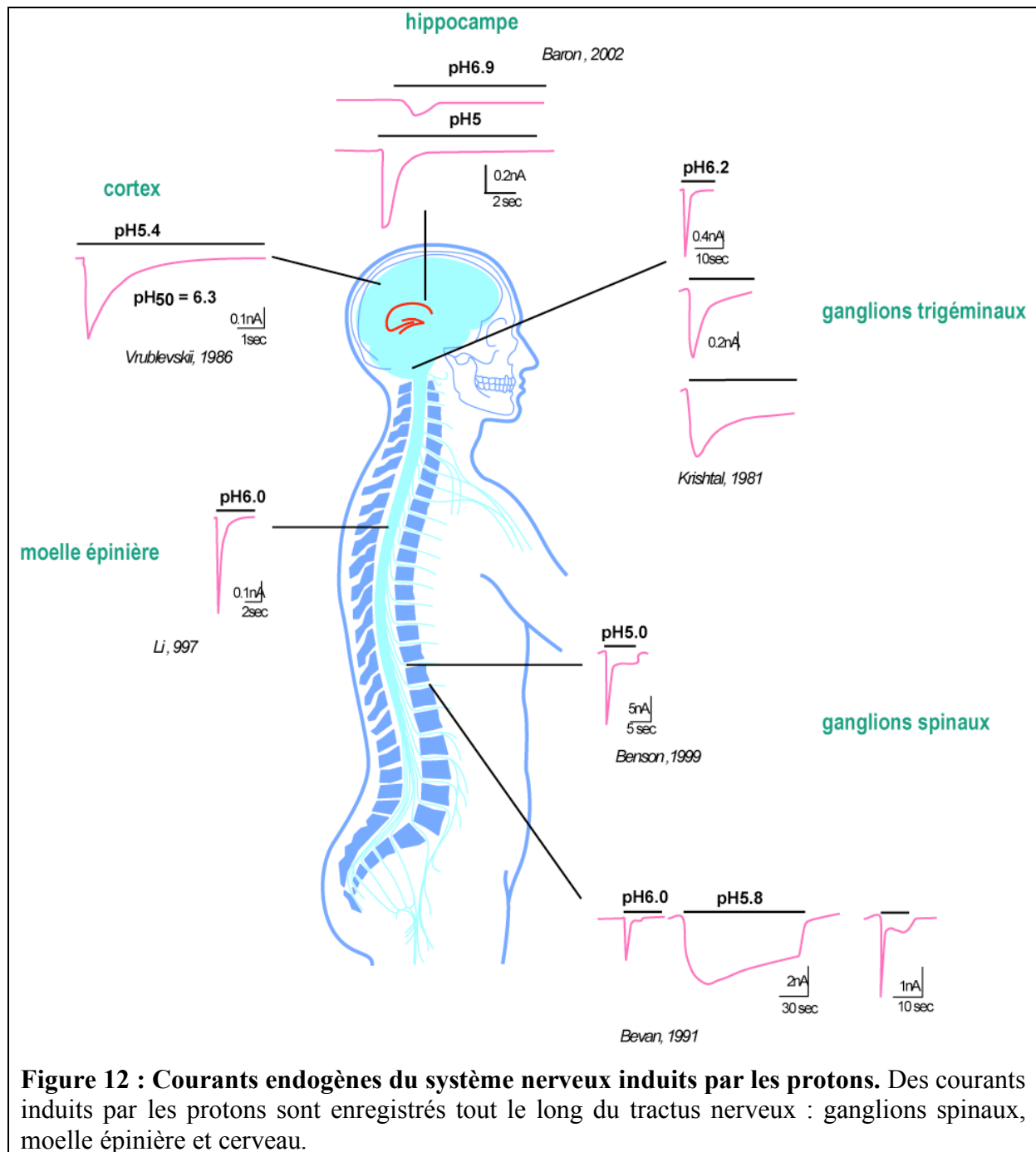


Figure 12 : Courants endogènes du système nerveux induits par les protons. Des courants induits par les protons sont enregistrés tout le long du tractus nerveux : ganglions spinaux, moelle épinière et cerveau.

2.6.4.2 La sensibilité à l'ATP

La famille des récepteurs à l'ATP se scinde en deux groupes : les canaux ioniques P2X et les récepteurs P2Y couplés aux protéines G (Surprenant et al. 1995). Les canaux P2X forment à une famille des récepteurs ionotropiques qui comprend sept sous-types de récepteurs, P2X1 à P2X7. Ces récepteurs sont activés par l'ATP extracellulaire (Prasad et al. 2001; Florenzano et al. 2002). L'ATP injecté par voie

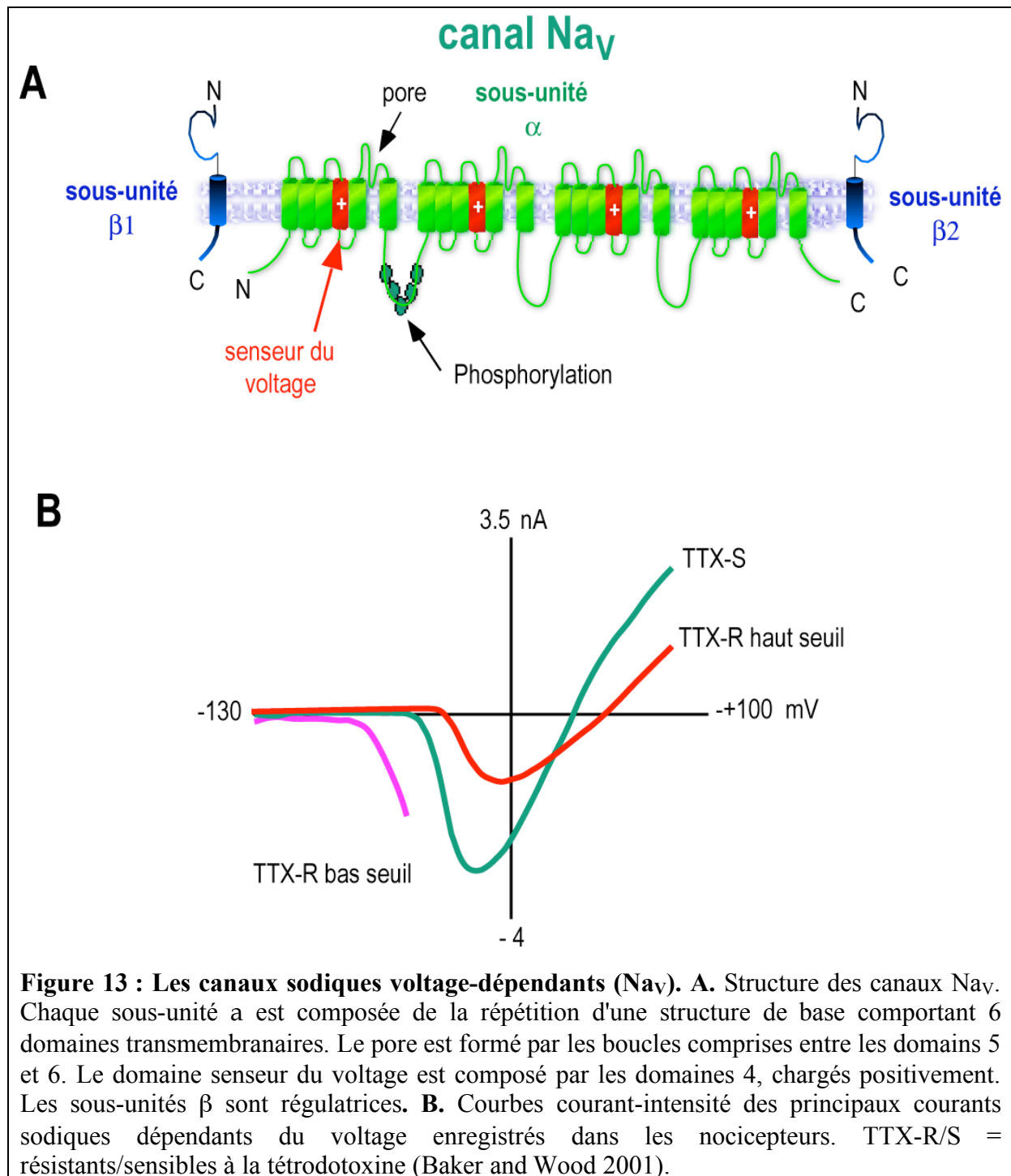
artérielle provoque de la douleur en stimulant les fibres C et A δ dans la peau et les articulations (Dowd et al. 1998; Burnstock 2000). Appliqué sur les neurones sensoriels en culture, l'ATP induit des courants entrants cationiques à désensibilisation rapide (Krishtal et al. 1988). Ces courants peuvent être reproduits en système hétérologue par la co-expression du canal ionique P2X2 et du canal ionique P2X3, spécifique des nocicepteurs non peptidergiques (Chen et al. 1995; Lewis et al. 1995; Vulchanova et al. 1998). Les récepteurs P2X3 sont particulièrement exprimés dans les neurones sensoriels des ganglions spinaux justement sous forme d'homomères et d'hétéromères (P2X3/P2X2) (Burnstock 2000). Sur le plan physiopathologique, l'ATP relargué par des cellules endommagées active les récepteurs P2X3 et initie le signal nociceptif (Ding et al. 2000; Burnstock 2001). Chez les souris invalidées pour le gène qui code P2X3, ces courants ne sont plus enregistrés, et les souris présentent une diminution de la réponse à l'injection d'ATP et un affaiblissement de la douleur inflammatoire (Cockayne et al. 2000; Souslova et al. 2000). De même, une perte de l'encodage des températures tièdes est observée, suggérant une collaboration avec les canaux TRPV de la peau pour cette fonction. Il est également possible que le canal P2X3 ait un rôle pré-synaptique dans le relargage de glutamate au niveau de la corne dorsale (Ding et al. 2000; Souslova et al. 2000). La régulation positive de l'expression de P2X3 dans la corne dorsale et dans le ganglion spinal a été décrite dans différents modèles de lésion neuropathique chez l'animal (Novakovic et al. 1999; Burnstock 2000; Ding et al. 2000; Burnstock 2001). Les effets d'un médiateur chimique comme l'ATP sont complexes et peuvent être paradoxaux selon leur cible : l'injection intrathécale d'ATP peut avoir une action analgésique en activant une conductance potassique chez les neurones de la corne dorsale (Salter et al. 1992). Bien que les récepteurs P2X3 et P2X3/2 ne semblent pas avoir de rôle majeur dans la médiation des douleurs inflammatoires et viscérales aiguës alors que les récepteurs P2X4 et P2X7 semblent responsables de l'afflux de cellules microgliales au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, ces récepteurs purinergiques semblent constituer des cibles intéressantes pour le développement de molécules antalgiques.

2.7 La propagation du signal nociceptif

2.7.1 Les canaux sodiques dépendants du voltage

L'activation des récepteurs membranaires dépolarise les fibres sensorielles et ainsi active les canaux sodiques dépendants du voltage (Nav) responsables du déclenchement des potentiels d'action qui seront transmis aux neurones centraux. Ils ont un rôle crucial dans de nombreuses neuropathies chroniques douloureuses observées après des lésions des nerfs périphériques (Lai et al. 2003). Des observations physiologiques et pharmacologiques suggèrent que les canaux sodiques voltage-dépendants jouent un rôle majeur à la fois dans le développement et dans le maintien de l'hyperexcitabilité neuronale post-lésionnelle observée au niveau des afférences primaires des neurones (neurale ou tissulaire) (Lai et al. 2004). Ces canaux sodiques voltages dépendant forment une famille de neuf sous-unités α structuellement proches (Nav1.1 à Nav1.9). Ces sous-unités sont distribuées différemment dans le système nerveux, au niveau central et/ou périphérique et s'associent à une ou plusieurs sous-unités accessoires β (β_1 à β_3) (Catterall 2000; Goldin et al. 2000; Lai et al. 2003; Wood et al. 2004). Chaque canal Nav est donc constitué par une sous-unité α qui forme le pore et fonctionne avec deux sous-unités modulatrices β qui sont des molécules d'adhésion liées au cytosquelette (Fig.13). À l'exception de Nav1.4, il semble que tous soient exprimés dans les neurones sensoriels (Novakovic et al. 2001; Lai et al. 2003; Lai et al. 2004). D'un point de vue pharmacologique, ces canaux sont distingués par leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX, toxine du tétrodon) : ils sont soit TTX-sensibles (TTX-S) et inhibés par de faibles concentrations en TTX (~ 1 nM), soit TTX-résistants (TTX-R) et insensibles à de grandes concentrations de cette toxine (~ 1 mM) (Fjell et al. 2000; Lai et al. 2003). Les fibres nociceptives se distinguent en trois catégories en fonction des courants sodiques exprimés : (i) type A qui n'expriment que des courants TTX-S avec un potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$) des canaux de -65 mV, (ii) type B qui en plus expriment des courants à haut seuil d'activation TTX-R1 ($V_{1/2} = -29$ mV) et TTX-R2 ($V_{1/2} = -48$ mV), (iii) type C avec uniquement un courant TTX-R3 à bas seuil d'activation (Fig.12) (Rush et al. 1998). Il est possible que les canaux TTX-R déterminent le haut seuil d'activation des nocicepteurs car ils sont activés à de plus hauts potentiels membranaires que les TTX-S. De même, leur vitesse de réactivation plus rapide que

celle des canaux TTX-S pourrait intervenir dans l'établissement et le maintien du codage en fréquence de l'information douloureuse.



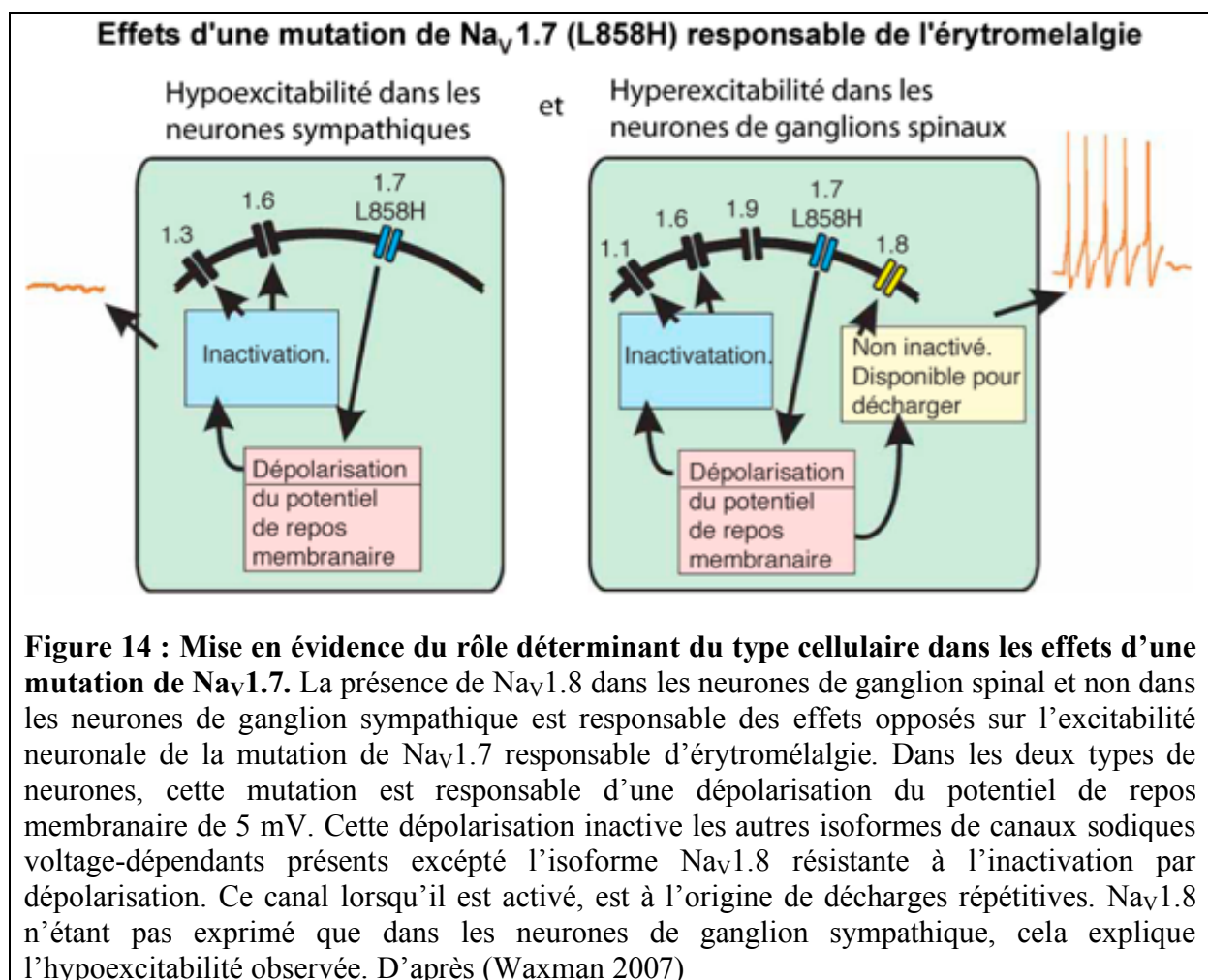
2.7.1.1 Les canaux sodiques voltage-dépendant sensibles à la TTX

Nav1.6 est présent dans tous les neurones sensoriels. Nav1.3 est particulièrement exprimé dans les neurones sensoriels embryonnaires mais son niveau d'expression diminue drastiquement chez l'adulte (Lai et al. 2004). Le niveau d'expression de Nav1.3 est très augmenté lors de lésion de nerfs périphériques et de la moelle épinière (Cummins et al. 2001; Hains et al. 2003).

Nav1.7 est particulièrement exprimé sélectivement au niveau des ganglions spinaux dans les neurones nocicepteurs mais aussi dans les ganglions du système nerveux parasympathique. En raison de sa longue phase réfractaire, Nav1.7 répond à de petites dépolarisations lentes et ainsi amplifie les réponses de petits stimuli qui sans lui ne pourraient atteindre le seuil de génération d'un potentiel d'action. Son rôle dans le contrôle du gain des nocicepteurs est illustré par une augmentation des seuils d'activation dans la douleur mécanique et thermique ainsi que par une diminution de la douleur inflammatoire chez les souris invalidées pour le gène codant Nav1.7 dans les nocicepteurs (Nassar et al. 2004). Plus récemment, des mutations dominantes négatives de ce gène ont été mises en évidence chez des familles de sujets présentant une Indifférence Congénitale à la Douleur (Cox et al. 2006). Des mutations gain de fonction dominantes du gène codant pour Nav1.7 induisent chez l'Homme deux une maladie particulière, les douleurs paroxystiques extrêmes et l'érythromelalgie (Waxman and Dib-Hajj 2005). Cette maladie rare autosomique dominante se caractérise par des douleurs cuisantes accompagnées d'érythrodermie et d'une augmentation de la chaleur irradiée au niveau des extrémités. Ces deux types de mutations confirment le rôle majeur de ce canal dans la perception de la douleur (Cummins et al. 2004; Nassar et al. 2004; Yang et al. 2004).

Sur plan conceptuel, il est intéressant de remarquer que les mutations de Nav1.7 responsables de l'érythromelalgie induisent une dysfonction des neurones nocicepteurs des ganglions spinaux est différente de celle des neurones des ganglions sympathiques. En effet, les neurones nocicepteurs sont rendus hyperexcitables par ces mutations et produisent spontanément des sensations douloureuses (Dib-Hajj et al. 2005; Waxman and Dib-Hajj 2005) alors que les neurones sympathiques sont rendus hypoexcitables et produisent des réponses sympathiques vasomotrices aberrantes responsables des modifications de la couleur cutanée (Mork et al. 2002;

Davis et al. 2003). Cette différence met en évidence l'importance du milieu cellulaire dans lequel une mutation est exprimée. L'expression d'un autre canal sodique voltage-dépendant résistant à la TTX, Nav1.8 par les neurones nocicepteurs des ganglions spinaux et non par les neurones des ganglions sympathiques inverse les conséquences du gain de fonction de la mutation (Fig.14). Ceci montre qu'une mutation d'un canal sodique n'est pas l'unique cause de la modification des réponses neuronales. Dans cet exemple, l'effet fonctionnel de la mutation de Nav1.7 est filtré par la présence ou l'absence d'une autre molécule électrogénique, Nav1.8.



2.7.1.2 Les canaux sodiques voltage-dépendant résistants à la TTX

Nav1.8 est le canal sodique voltage-dépendant qui présente le plus haut seuil d'activation. Son seuil d'ouverture se situe à plus de 20 mV au-dessus du seuil des autres canaux sodiques voltage-dépendants (Akopian et al. 1996; Sangameswaran et al. 1996a; b; Cummins and Waxman 1997; Catterall et al. 2005a), ce qui le rend

disponible pour des activations alors que les cellules sont déjà dépolarisées. Dans les neurones de ganglion spinal, ces canaux génèrent 80 % des courants accentuant la phase active des potentiels d'action et sont à l'origine du potentiel de décharge répétitif (Renganathan et al. 2001; Blair and Bean 2002).

Les canaux Nav1.8 sont exprimés dans les fibres de type A. Du point de vue expérimental, les souris invalidées pour le canal Nav1.8, qui est donc exprimé dans les nocicepteurs, perdent toutes les formes de courants TTX-R et présentent une analgésie lors de stimulations nocives thermiques et mécaniques, ainsi qu'un retard à l'instauration de l'hyperalgésie inflammatoire (Akopian et al. 1999). Précisément, le canal Nav1.8 est en partie responsable de l'hyperalgésie thermique induite par le facteur de croissance nerveux NGF (Kerr et al. 2001). L'inhibition spécifique de Nav1.8 diminue significativement la douleur résultant de lésions axonales des afférences somatiques ou d'inflammation tissulaire (Fig.5). Il a également été démontré que les canaux Nav1.8 sont impliqués dans l'activation des nerfs afférents après une irritation chimique de la vésicule biliaire (Porreca et al. 1999; Yoshimura et al. 2001). Le rôle nociceptif de ces canaux TTX-R est renforcé par le fait qu'ils sont inhibés par les anesthésiques locaux tels que la bupivacaïne et la lidocaïne (Scholz et al. 1998).

L'expression de Nav1.7 et de Nav1.8 est régulée positivement dans les neurones de ganglions spinaux lors d'inflammation et contribue ainsi à la perception des douleurs inflammatoires chez l'individu normal (cf Fig. 5).

Dans certaines conditions pathologiques, l'expression de Nav1.8 ne se limite plus au système nerveux périphérique, on observe son expression dans les cellules de Purkinje du cervelet dans la sclérose en plaque alors qu'il n'y est pas détectable en conditions normales.

Des molécules à visée thérapeutique dirigées contre Nav1.8 élaborées à partir des données de structure-fonction connues sont déjà en cours de développement.

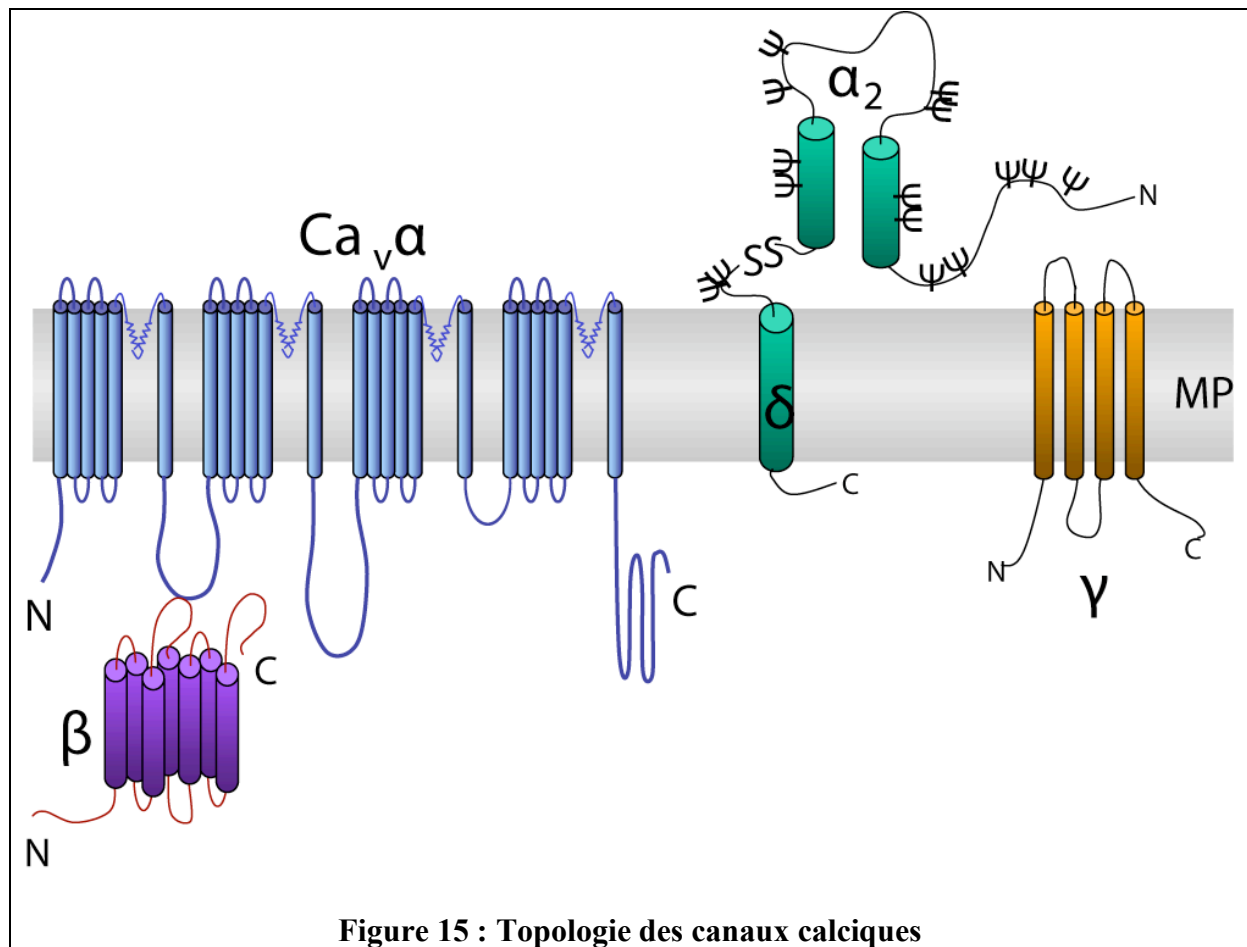
Comme les canaux Nav1.8, les canaux Nav1.9 sont particulièrement exprimés au niveau des ganglions spinaux dans les neurones de petit diamètre. Nav1.9 est exprimé dans les fibres C, tandis que Nav1.8 est mis en évidence au niveau des fibres de type A (Lai et al. 2004). Peu de données ont été rassemblées au sujet du rôle de Nav1.9 dans la douleur neuropathique en dehors de sa localisation observée au niveau des ganglions spinaux (Lai et al. 2004), et de ses propriétés

électrophysiologiques. En effet, les propriétés cinétiques de $\text{Na}_v1.9$ suggèrent qu'il est actif au potentiel de repos membranaire et pourrait ainsi moduler le potentiel de repos membranaire des nocicepteurs et leur réponse à des stimulations en dessous de leur seuil d'activation (Fang et al. 2002; Lai et al. 2003). Les souris invalidées pour le gène codant ce canal ont permis de mettre en évidence une implication directe de $\text{Na}_v1.9$ dans la douleur inflammatoire. Ce canal est également exprimé au niveau de l'hippocampe où il est activé par le BDNF. Le fait que son expression ne soit pas limitée au niveau des ganglions spinaux rend ce canal beaucoup moins attractif comme candidat en tant que cible thérapeutique pour traiter la douleur (Lai et al. 2003).

2.8 *La transmission du signal nociceptif au système nerveux central.*

2.8.1 Les canaux calciques voltage-dépendants.

Ces canaux calciques sont exprimés au niveau des nocicepteurs, plus particulièrement au niveau des terminaisons présynaptiques spinales des neurones des ganglions spinaux où ils contrôlent le relargage des neurotransmetteurs (Catterall et al. 2003) ainsi qu'au niveau des terminaisons nerveuses périphériques. Les canaux calciques sont composés de plusieurs sous-unités, la sous-unité $\alpha1$ contenant le pore ionique, le filtre sélectif ionique du pore, le senseur de voltage et les sites de fixation aux drogues et de sous-unités auxiliaires β , γ , $\alpha2\delta$ qui modulent les fonctions de la sous-unité $\alpha1$. La sous-unité $\alpha1$ définit le sous-type de canal. Actuellement, 10 gènes codent des sous-unités $\alpha1$ des canaux calciques : $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v1.4$, $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, $\text{Ca}_v3.3$. Trois familles de ces canaux ont été différenciées, en fonction de leur degré d'homologie (avec au sein d'une même famille plus de 80% d'homologie) : la famille Ca_v1 . ($\text{Ca}_v1.1-4$) correspondant aux courants de type L, la famille Ca_v2 . comprend trois membres, $\text{Ca}_v2.1$ correspondant aux courants de type P/Q, $\text{Ca}_v2.2$ aux courants de type N et $\text{Ca}_v2.3$ aux courants de type R, enfin, la famille Ca_v3 ($\text{Ca}_v3.1-3.3$) correspondant aux courants de type T (Catterall et al. 2003) (Fig.15). Les familles 1 et 2 partagent 52% de leur séquence en acides aminés et seulement 28% avec la troisième famille (Ertel et al. 2000). À la diversité génique s'ajoute également celle induite par les épissages alternatifs.



2.8.1.1 Les canaux calciques de type N

Dans le domaine de la recherche de molécules antalgiques ou analgésiques, un intérêt tout particulier est porté aux canaux calciques de type N, $Ca_v2.2$. En effet, de nombreux travaux impliquent les canaux $Ca_v2.2$ dans la transmission du signal nociceptif au niveau médullaire (Altier and Zamponi 2004). Le relargage de neuropeptides comme la substance P est stopé par les bloqueurs des canaux calciques de type N. Ainsi, l'inhibition de ces canaux calciques entraîne la suppression de la douleur (Catterall et al. 2003).

Dans un modèle de douleur neuropathique, la composition et le niveau d'expression des canaux de type N sont soumis à d'importantes variations. Dans un modèle de ligature des nerfs spinaux, l'expression de la sous-unité $\alpha1B$ est augmentée dans la corne dorsale de la moelle épinière au cours du développement de la douleur (Cizkova et al. 2002). Les souris invalidées pour la sous-unité $\alpha1B$ sont moins sensibles lors de la phase inflammatoire du test au formol intraplantaire

(Hatakeyama et al. 2001; Kim et al. 2001).

De plus, une diminution de la sensibilité à l'inflammation et aux douleurs neuropathiques est observée chez les souris invalidées pour le gène codant les canaux calciques $Ca_v2.2$ (Catterall et al. 2003). Les canaux $Ca_v2.2$ exprimés par les neurones sensoriels contribuent aux effets analgésiques de la morphine *via* les récepteurs opioïdiques couplés aux protéines G. En effet, les récepteurs opioïdiques inhibent les canaux calciques de type N par un processus dépendant du voltage ce qui résulte en une inhibition des courants de type N et contribue aux effets analgésiques des opiacés (Seward et al. 1991; Bourinet et al. 1996). De plus, il semble qu'un récepteur opioïdique, le récepteur ORL1 (voir 5.4.4.1) forme un complexe avec les sous-unités $Ca_v2.2$ ($\alpha1B$) et produise une inhibition des courants de type N en l'absence de stimulation (Beedle et al. 2004). Le contrôle du relargage des neurotransmetteurs est une autre fonction essentielle des canaux de type N. Ces canaux ont une forte association avec les complexes protéiques responsable de la fusion des vésicules de neurotransmetteurs (Yokoyama et al. 1997; Mochida et al. 1998; Vance et al. 1999; Jarvis et al. 2002).

Plusieurs modèles animaux ainsi que des études cliniques ont démontré que des bloqueurs des canaux $Ca_v2.2$ inhibent les symptômes de la douleur quand ils sont injectés de intrathécalement (i.t.). Une ω -Agatoxine, l' ω AgaIVA, extraite de l'araignée *Agelenopsis aperta* et les ω -conotoxines (ω - désigne des toxines ciblant les canaux calciques) inhibent aussi la douleur neuropathique. Le ziconotide, un analogue synthétique de la toxine ω CMVIIA, un peptide de 25 acides aminés issu de *Conus magnus* a été développé pour le traitement des douleurs neuropathiques. L'essai clinique Prialt est le premier essai clinique validant les progrès de la recherche dans le domaine des canaux ioniques et du traitement moléculaire de la douleur. Ce peptide, malheureusement limité à une voie d'administration intrathécale, compte tenu de ses effets sur le système cardiovasculaire, est efficace dans de nombreux type de situations cliniques douloureuses (Jain 2000; Miljanich 2004; Wermeling 2005). La fenêtre thérapeutique est très proche des doses auxquelles apparaissent les effets indésirables (Penn and Paice 2000). Ces toxines agiraient en bloquant la transmission synaptique. Ce blocage est indépendant à la fois du voltage et de la fréquence alors que la récupération après blocage par la toxine semble dépendante du voltage (Feng

et al. 2003). L'absence de modulation de cette inhibition est responsable de la fenêtre thérapeutique étroite observée en clinique. Une autre toxine de cône, l' ω CGVIA provenant du venin du *Conus geographicus*, un peptide de 27 acides aminés bloque les potentiels postsynaptiques excitateurs dans la moelle épinière et ce de façon plus puissante chez des animaux rendus neuropathiques sans qu'aucun changement d'expression du canal $\text{Ca}_v2.2$ ne soit observé (Chaplan et al. 1994; Bowersox et al. 1996; Sluka 1997; 1998; Yamamoto and Sakashita 1998; Wang et al. 2000; Scott et al. 2002; Wermeling 2005). Elle potentialise également les effets de la morphine en coadministration (Pirec et al. 2001). Chez le rat, l'administration de l' ω -grammatoxine SIA provenant de la mygale *Grammostola spatulata* produit des effets morphine-like sans activer les récepteurs opioïdiques (Penn and Paice 2000; Zamponi and McCleskey 2004). La conotoxine ω -conotoxine CVID isolée de *Conus catus*, offre des avantages que n'ont pas les autres conotoxines (Yamamoto and Sakashita 1998; Scott et al. 2002). Elle possède une haute affinité pour $\text{Ca}_v2.2$ et possède une plus grande spécificité pour les canaux de type N que pour les canaux de type P/Q ($\text{Ca}_v2.1$). Le blocage de ces canaux P/Q proche des canaux $\text{Ca}_v2.2$ est le plus grand obstacle dans le développement de petites molécules spécifiques inhibant spécifiquement $\text{Ca}_v2.2$. Une publication rapporte que les effets cardiovasculaires de la ω -conotoxine CVID seraient moins importants que ceux du ziconotide (Wright et al. 2000) et il semble que ce peptide bloque un variant de $\text{Ca}_v2.2$ dans les neurones parasympathiques préganglionnaires qui ne sont pas affectés par les propriétés inhibitrice du ziconotide (Adams et al. 2003). Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence une sélectivité pour des variants d'épissage de $\text{Ca}_v2.2$ et pourraient conduire à la découverte de molécules dirigées sélectivement contre un tel variant de $\text{Ca}_v2.2$. Une isoforme des canaux $\text{Ca}_v2.2$ et exprimée principalement par les petits neurones nocicepteurs a été mise en évidence (Bell et al. 2004; Zamponi and McCleskey 2004).

Les états douloureux sont caractérisés par des décharges inhabituelles à haute fréquence. De petites molécules inhibitrices de ces canaux dans leur conformation active pourraient bloquer spécifiquement ces décharges et discriminer l'état 'normal' du canal de l'état qui l'associe à une sensation douloureuse.

Malgré tout, étant donné la vaste distribution des canaux calciques,

l'utilisation des toxines non spécifiques entraîne des effets secondaires importants (bradycardie, nausées, nystagmus, agitation, hallucinations, diarrhée...). Chez certains patients ayant reçu du ziconotide à dose efficace, ces effets peuvent persister plusieurs semaines après l'arrêt du traitement (Gomora et al. 2002).

2.8.1.2 Les canaux calciques de type P/Q

Les autres membres de la famille des Cav2 ne sont pas reconnus actuellement comme de bonnes cibles thérapeutiques dans le traitement moléculaire de la douleur. Des mutations des Cav2.1 sont responsables de certaines formes d'ataxie congénitale et d'une forme particulière et familiale de migraine (Kraus et al. 1998; Hans et al. 1999; Jun et al. 1999; Knight et al. 2002; Tottene et al. 2002; Barrett et al. 2005; Cao and Tsien 2005). Un venin d'araignée, l' ω -agatoxin-IVA est un bloqueur spécifique de ces canaux qui administré intrathécalement produit une diminution des manifestations douloureuses dans le modèle du formol intraplantaire chez la souris alors que la dihydropyridine n'était pas efficace (Murakami et al. 2004).

2.8.1.3 Les canaux calciques de type T

Les canaux de type T forment une sous-famille composée de trois canaux Cav3.1-3. Ils sont les derniers membres de la famille des canaux calciques voltage-dépendants à avoir été clonés et se distinguent des deux autres sous-familles de canaux calciques voltage-dépendant par le fait que les sous-unités Cav3 α 1 ne s'associent pas avec les sous-unités auxiliaires β , α 2 δ et γ (Lambert et al. 1997; Leuranguer et al. 1998; Lacinova et al. 1999). Ils tiennent leur nom de canaux de bas seuil en raison de leur seuil d'activation hyperpolarisé. Ces canaux sont largement distribués dans l'organisme, au niveau du cœur, du pancréas, du muscle lisse, du rein et du système nerveux. Chacun d'entre eux est distribué différemment des deux autres cependant, seul Cav3.3 est retrouvé exclusivement dans le système nerveux central (Lee et al. 1999). Les fonctions importantes de ces canaux en dehors du système nerveux central laissent penser que le développement de molécules dirigées contre eux pourrait avoir d'importants effets indésirables. Dans les neurones l'activation des canaux de type T par de petites dépolarisations induit des potentiels

d'action calcique de bas seuil qui peuvent à leur tour déclencher des décharges de canaux sodiques voltage dépendants (Goldberg et al. 2004). Les phénomènes d'activation rythmique ou d'oscillation dans les réseaux neuronaux du système nerveux central sont dus en partie à ces courants. Des mutations de ces canaux sont responsables d'épilepsies familiales (Rogawski 2002; Khosravani et al. 2005; Nahm et al. 2005; Vitko et al. 2005; Mazzuca et al. 2006; Peloquin et al. 2006) (voir Annexe).

Au niveau des circuits de la douleur, les courants de type T sont enregistrés dans les petits et les moyens neurones des ganglions spinaux (Scroggs and Fox 1992; Yusaf et al. 2001; Shin et al. 2003; Bourinet et al. 2005). L'administration intrathécale d'oligonucléotide antisense spécifique de Cav3.2 réduit considérablement la densité de courant dans les neurones de ganglion spinal de tailles moyenne et petite et augmente le seuil douloureux dans un modèle de douleur neuropathique (Bourinet et al. 2005). Dans la même étude, des oligonucléotides antisense spécifiques de Cav1.3 et Cav3.3 n'ont pas eu d'effet sur la réponse nociceptive. Les canaux de type T jouent également un rôle important au niveau des neurones thalamiques impliqués dans les voies de la douleur. Malheureusement, il n'existe pas d'outils pharmacologiques discriminant les sous-unités des canaux calciques de type T. Il existe cependant plusieurs agents pharmacologiques sur le marché qui interagissent avec ce type de canal. Ces molécules sont utilisées comme antiépileptiques (éthosuximide et zonisamide) ou comme anti-hypertenseur (mibefradil), et ont été testés dans des modèles de douleur chez l'animal. Dans un modèle de ligature de nerf spinal, l'éthosuximide et le mibefradil induisent une réduction dose-dépendante de l'allodynie et de l'hyperalgésie thermique (Dogrul et al. 2003). D'autres études ont mis en évidence un effet significatif de bloqueur des canaux calciques voltage-dépendant de type T dans d'autres modèles de douleur neuropathique et de douleur inflammatoire (Todorovic et al. 2002; Dogrul et al. 2003; Barton et al. 2005) mais aussi dans un modèle de douleur neuropathique pharmaco-induite par la vincristine ou le paclitaxel (Flatters and Bennett 2004). Dans un modèle de douleur neuropathique, le zonisamide produit aussi une augmentation du seuil douloureux (Hord et al. 2003; Tanabe et al. 2005). Malgré l'absence de spécificité de ces molécules pour un sous-type de ces canaux de type T et l'absence d'étude clinique correcte testant leur efficacité dans la douleur, il existe cependant quelques rares publications

rapportant leurs effets antalgiques en clinique (Takahashi et al. 2004).

2.8.1.4 Les canaux de type L

Les canaux de type L forment une famille de quatre membres parmi lesquels Cav1.1, Cav1.2 et Cav1.3 produisent des courants de type L, alors que le courant de Cav1.4 n'est pas encore bien caractérisé (Catterall et al. 2005b). Les bloqueurs de ces canaux sont utilisés en cardiologie comme antihypertenseurs et anti-arythmiques (Dihydropyridine, phénylalamines et benzothiazépines) (Triggle 2006). Dans les neurones, les courants de type L contribuent à de nombreuses fonctions dont le relargage calcium-dépendant des neurotransmetteurs, mais aussi d'autres fonctions intracellulaires du calcium comme la régulation de l'expression de canaux potassiques (Zanzouri et al. 2006)(voir Annexe) et l'activation des canaux potassiques activés par le calcium. Bien que les Cav1 sont regroupés classiquement dans les canaux calciques à haut seuil d'activation, les Cav1.3 et Cav1.4 sont activés par des dépolarisations plus faibles. Ils s'activent plus rapidement et présentent une sensibilité plus faible aux dihydropyridines (Xu and Lipscombe 2001; Lipscombe et al. 2004). Dans les ganglions spinaux tous les sous-types de canaux L sont exprimés. Le niveau d'expression des deux principaux canaux de type L, Cav1.2 et Cav1.3 est variable selon les modèles de douleur neuropathique (Kim et al. 2001; Bell et al. 2004). Une diminution de ces courants après lésion nerveuse pourrait entraîner la réduction des courants potassiques activés par le calcium et augmenter l'excitabilité neuronale. Dans ces conditions, on pourrait s'attendre à ce que des bloqueurs de ces canaux aient des effets positifs sur la perception douloureuse. Cependant, l'administration intrathécale de bloqueurs de ces canaux n'a pas d'effet sur la réponse à la douleur (Chaplan et al. 1994). De même, que le blocage de ces canaux n'a pas eu d'effet dans un modèle de neuropathie diabétique (Calcutt and Chaplan 1997) et de neuropathie induite par la vincristine (Fukuizumi et al. 2003). Une autre étude rapporte que le blocage pharmacologique des canaux de type L potentialise les effets analgésiques des opioïdes (Gullapalli and Ramarao 2002). Il semble difficile d'envisager le développement de molécules dirigées contre des cibles aussi peu discriminables et ouvrant aussi peu de perspectives thérapeutiques.

2.8.1.5 Les sous-unités auxilliaires $\alpha 2\delta$ -1

Dans la douleur neuropathique, il semble que les sous-unités $\alpha 2\delta$ -1 jouent un rôle majeur. En effet, l'expression de cette sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 est très augmentée, à la fois au niveau du transcript que de la protéine, après une lésion nerveuse (Newton et al. 2001). La gabapentine, une drogue anti-épileptique ayant des propriétés antalgiques, se lie à cette sous-unité avec une forte affinité. La gabapentine injectée intrathécalement supprime l'allodynie avec un effet dose-dépendant et est sans effet sur le comportement chez le rat sain (Luo et al. 2001). Comme l'augmentation d'expression de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 n'est pas accompagnée d'une augmentation similaire de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et β , il semble qu'elle ait un rôle fonctionnel supplémentaire différent de son rôle modulateur des canaux calciques voltage-dépendants (Luo et al. 2001).

2.9 Les neurotransmetteurs

2.9.1 Introduction

En situation physiologique, la transmission synaptique entre les fibres C et les neurones de la corne dorsale est largement médiée par le relargage de glutamate qui agit sur les récepteurs AMPA générant des potentiels post-synaptiques excitateurs rapides, suivis de traces lentes dues à l'activation des récepteurs NMDA (King et al. 1988; Yoshimura and Jessell 1990). La synthèse et/ou l'utilisation d'autres couples neurotransmetteurs/récepteurs varie en fonction de la nature de la stimulation et de la situation (inflammation, neuropathie). Ainsi, les fibres C peptidergiques co-expriment le peptide "brain-derived neurotrophic factor" (BDNF) qui lie le récepteur trkB, la substance P qui lie le récepteur NK1 et le peptide CGRP qui lie son récepteur couplé aux protéines G. Le BDNF n'est relargué qu'à la suite de trains courts de potentiels d'action à hautes fréquences alors que la substance P peut être relarguée consécutivement à la fois à des trains continus de potentiels à basse fréquence et à des trains téтанisants à hautes fréquences (Lever et al. 2001). D'autres neurotransmetteurs sont identifiés dans ce premier relais nociceptif et peuvent être impliqués dans sa plasticité en situation pathologique. C'est le cas de l'ATP qui en agissant sur les récepteurs P2X pré-synaptiques et P2Y post-synaptiques faciliterait la

transmission glutamatergique (Vulchanova et al. 1998; Woolf and Costigan 1999; Ding et al. 2000).

2.9.2 Neuropeptides

2.9.2.1 La substance P

La substance P (SP) est probablement le neurotransmetteur dont le rôle est le mieux connu. La SP a été découverte par Euler et Gaddum en 1931 dans le cerveau et l'intestin de cheval. Leur extrait était sous forme de poudre et la nommèrent substance P. Elle fut le premier peptide pour lequel la fonction transmettrice a été suspectée. En 1953, plusieurs équipes (Lembeck 1953; Pernow 1953) ont localisé la SP au niveau des terminaisons nerveuses de la corne dorsale de la moelle épinière. Lembeck émit l'hypothèse que la SP pourrait être un neurotransmetteur au niveau des terminaisons afférentes primaires (Lembeck 1953).

D'autres études confirmèrent cette hypothèse, en 1971, Leeman et collaborateurs ont déterminé la structure de la SP (Chang et al. 1971). Actuellement, le rôle de neurotransmetteur sensoriel de la SP est pleinement établi. La SP est particulièrement exprimée par une sous-population de fibres afférentes primaires qui se terminent dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière. La SP fait partie de la famille des tachikines. Le gène codant le précurseur de la SP, la préprotachikine A code également la Neurokinine-A. La Neurokinine-B appartient également à la famille des tachikines. La SP participe à l'inflammation neurogénique en induisant une vasodilatation et en stimulant le relargage d'histamine par les mastocytes. L'histamine va entre autres stimuler les terminaisons des fibres afférentes primaires. D'une manière générale, les tachikines favorisent la formation de l'œdème et l'extravasation de protéines plasmatiques. L'application de SP induit la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2) et par conséquent la prolifération de lymphocytes-T (Lundy and Linden 2004). Ces peptides agissent sur les récepteurs des neurokinines, NK1, NK2, NK3, qui ont une meilleure affinité respectivement pour la SP, la neurokinine-A et la neurokinine-B. Au niveau spinal, les récepteurs NK1 sont exprimés sur les neurones secondaires des voies nociceptives. Chez la Souris, dans un modèle de douleur neuropathique, le niveau de transcription de l'ARNm du

récepteur NK1 est augmenté au niveau de la moelle épinière (Taylor and McCarson 2004).

La SP, libérée par les neurones afférents primaires, ne provoque pas à elle seule des décharges nociceptives, mais elle potentialise l'effet du glutamate au niveau des neurones secondaires (Cousins and Poweer 1999). Pour ces différentes raisons de nombreux travaux ont étudié les effets des antagonistes des récepteurs aux neurokinines, en particulier NK1. Cependant, malgré des études précliniques prometteuses, les antagonistes du récepteur NK1 n'ont pas montré d'effet analgésique significatif chez l'Homme (Hill 2000).

2.9.2.2 Le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP)

Le peptide lié au gène de la calcitonine a été découvert en 1982, à la suite d'études mettant en évidence un épissage alternatif de l'ARNm du gène de la calcitonine. Le CGRP est exprimé ubiquitairement dans le système nerveux mais avec une prédominance pour les fibres sensibles afférentes primaires où il est fréquemment colocalisé avec la SP (Lundy and Linden 2004). Le CGRP agit par l'intermédiaire de deux récepteurs, CGRP1 et CGRP2. Ces récepteurs sont couplés aux protéines Gs qui activent l'adénylate cyclase (Juaneda et al. 2000). Au niveau de la moelle épinière, le CGRP, comme la SP, potentialise les effets excitateurs du glutamate. En périphérie, le CGRP favorise l'inflammation neurogénique qui induit une sensibilisation des fibres nerveuses périphériques (Cousins and Poweer 1999).

2.9.2.2.1 Implication du CGRP dans la pathophysiologie de la migraine.

Le CGRP est particulièrement exprimé dans les terminaisons des fibres nerveuses qui innervent les vaisseaux du cerveau (Edvinsson 1985; Uddman et al. 1985). En effet, le CGRP (ainsi que la SP et la neurokinine-A) libérée par les fibres C du nerf trijumeau favorise la dilatation des vaisseaux méningés, provoque une extravasation plasmatique, active les plaquettes et la dégranulation des mastocytes. Le taux sérique de CGRP est augmenté chez les patients en crise migraineuse, alors que les taux des autres neuropeptides ne sont pas modifiés (Goadsby and Edvinsson 1994; Gallai et al. 1995; Doods 2001; Edvinsson 2001; Geppetti et al. 2005; Goadsby 2005; Tvedskov et al. 2005). De plus, les patients migraineux traités par voie veineuse

avec le CGRP présentent des céphalées dont les symptômes remplissent les critères diagnostiques de migraine (Lassen et al. 2002). Goadsby et Edvinsson ont publié en 1994 pour la première fois que le traitement d'une attaque de migraine par le sumatriptan, un antagoniste des récepteurs 5HT_{1D} de la sérotonine, reverse en partie l'élévation du taux plasmatique de CGRP (Goadsby and Edvinsson 1994; Lassen et al. 2002). Ceci a été confirmé dans une autre large étude utilisant le rizatriptan. Les auteurs en concluent que la diminution du taux plasmatique de CGRP correspond à la disparition de la migraine (Stepien et al. 2003). Il faut noter qu'il existe des patients réfractaires aux triptans et que chez ces patients réfractaires, les triptan n'induisent pas de diminution du taux sérique de CGRP (Sarchielli et al. 2006).

Jusqu'à ce jour, personne n'a pu expliquer la raison de ce relargage de CGRP dans la physiopathologie de la migraine. Le monitoring des taux plasmatiques de NO et de CGRP indique clairement que le relargage de NO précède celui du CGRP (Sarchielli et al. 2000). Le NO peut être responsable d'une augmentation de l'expression du gène codant la CGRP dans le ganglion trigéminal de rat (Bellamy et al. 2006). L'hypothèse qu'une dysfonction cérébrale primaire est à l'origine des crises migraineuses est de plus en plus acceptée. Une activation du tronc cérébral a été observée chez les patients en crise (Weiller et al. 1995; Afridi et al. 2005). Dans des modèles animaux, la stimulation du tronc cérébral peut entraîner l'activation du système trigéminovasculaire qui est à son tour responsable d'une vasodilatation CGRP-dépendante (Just et al. 2005). De plus les régions cérébrales riches en CGRP comme l'hypothalamus sont activées lors des crises migraineuses (Denuelle 2007). La dépression corticale responsable des attaques migraineuse chez les patients avec (Woods et al. 1994; Hadjikhani et al. 2001; Sanchez-del-Rio and Reuter 2004; Geraud et al. 2005) pourrait déclencher le relargage de CGRP et de NO responsables de la vasodilatation comme cela a été démontré expérimentalement (Wahl et al. 1994; Bolay et al. 2002). Toujours est-il que deux antagonistes spécifiques du CGRP sont en bonne voie pour devenir les prochaines molécules du traitement de l'accès migraineux (Olesen et al. 2004; Ho et al. 2007).

2.9.2.3 Le neuropeptide Y

Le neuropeptide Y (NPY) est un peptide de 36 acides aminés qui doit son nom aux résidus tyrosines (Y) situées aux extrémités N- et C-terminales du peptide. Il est présent en grande quantité dans le système nerveux central et périphérique, où il est surtout localisé dans les fibres sympathiques. Il y est en effet stocké et colibéré avec la noradrénaline. En plus de son implication dans la douleur, ce peptide participe entre autres à la régulation de prise de nourriture et à un effet anxiolytique, antiépileptique, vasoconstricteur et proangiogénique dans divers modèles animaux. Les récepteurs du NPY existent sous six isoformes (Y1 à Y6) dont des récepteurs couplés aux protéines Gi/o dont la liaison au NPY entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase (Silva et al. 2002; Chronwall and Zukowska 2004). Concernant la douleur, le NPY joue différents rôles en fonction de la zone de libération tissulaire.

Au niveau de la moelle épinière, l'injection de NPY inhibe la douleur notamment thermique. Dans le test au formol, l'injection intrathécale du NPY diminue les réponses nociceptives (Mahinda and Taylor 2004). Ces effets semblent médiés par le récepteur Y1, puisqu'un antagoniste de Y1 inhibe ces effets analgésiques. De plus les souris invalidées pour le gène du récepteur Y1 ont une plus grande sensibilité à la douleur thermique, mécanique, chimique et viscérale et cela également dans des modèles de douleur neuropathique. Sur le rat, on observe une diminution des récepteurs Y1 dans les ganglions spinaux au cours de douleurs neuropathiques (Brumovsky et al. 2004) alors que l'expression du récepteur Y2 est augmentée, ce qui expliquerait les effets analgésiques du NPY dans la douleur neuropathique (Naveilhan et al. 2001).

En périphérie, dans un modèle de lésion du nerf sciatique chez le rat, le neuropeptide Y ainsi qu'un agoniste spécifique des récepteurs Y2 augmentent l'hyperalgésie. Le récepteur Y1 participe au phénomène d'inflammation neurogénique en favorisant la libération de SP par les terminaisons nerveuses. Les souris invalidées pour le récepteur Y1 ne présentent pas d'inflammation neurogénique (Naveilhan et al. 2001).

Ainsi, le NPY semble jouer un rôle crucial dans le contrôle de l'information nociceptive. Le développement de molécules agonistes qui pourraient jouer au niveau spinal sur les récepteurs Y1 est envisageable.

2.10 Les voies centrales de la nociception

Comme exposé précédemment, une stimulation mécanique, chimique ou thermique recrutera des nocicepteurs qui conduiront l'information, par le premier neurone ou neurone primaire, jusqu'aux cornes postérieures de la moelle épinière. Une fois arrivé dans les cornes postérieures de la moelle épinière, il y aura le premier contact synaptique avec le deuxième neurone ou neurone secondaire. Les neurones secondaires, responsables des afférences nociceptives vers les centres supérieurs, se retrouvent principalement dans les laminae superficielles (I et II_{Interne}) et plus profondes (IV et V) de Rexed des cornes postérieures de la moelle (Fig.6). Il est toutefois important de noter que les cornes postérieures renferment un important réseau de convergences synaptiques impliquant des fibres collatérales et des interneurons. Le passage par la moelle sensorielle constitue une étape importante au cours de laquelle les informations nociceptives sont modulées. Son réseau neuronal complexe, qui comprend les terminaisons des neurones nociceptifs primaire, les neurones secondaires, des interneurons et les neurones des voies descendantes, renferme une multitude de neurotransmetteurs et une importante mosaïque de récepteurs qui vont moduler les afférences nociceptives avant qu'elles ne soient transmises vers les centres supérieurs. Les neurones nociceptifs de projection de la moelle se classent en deux groupes, les neurones de projections nociceptifs spécifiques et les neurones de projection nociceptifs non spécifiques:

(i) Les neurones nociceptifs spécifiques sont des neurones qui ne répondent qu'à des stimulations d'origine mécanique ou thermique dont l'intensité est potentiellement douloureuse. Ils peuvent être subdivisés en deux sous groupes suivant qu'ils sont recrutés uniquement par les fibres A δ ou par les fibres A δ et C.

(ii) Les neurones nociceptifs non spécifiques ou à large gamme dynamique sont des neurones avec de petits champs de récepteurs qui reçoivent des afférences des fibres A δ et C, mais aussi des fibres non-nociceptives A β . Ainsi ces neurones des cornes postérieures de la moelle épinière répondent de façon graduée à des stimulations dont l'intensité varie de non nociceptive à nociceptive. Ces petits champs récepteurs sont entourés d'un champ récepteur beaucoup plus grand qui répond de façon spécifique à des stimulations nociceptives un peu comme les neurones nociceptifs spécifiques. Il est important de noter que les neurones

nociceptifs non spécifiques sont dynamiques et que les champs récepteurs sont composés de surfaces excitatrices mais aussi inhibitrices et que des modifications de ces champs récepteurs jouent un rôle actif dans certaines douleurs chroniques. Par exemple, il a été démontré chez l'animal que la présence de douleurs inflammatoires peut modifier les champs récepteurs des neurones au niveau spinal en augmentant la fréquence des décharges et la population des neurones nociceptifs qui répondront à une stimulation donnée.

Le neurone secondaire croisera immédiatement dans la moelle en passant sous le canal de l'épendyme pour former la voie spinothalamique en position ventrolatérale de la moelle et conduira l'information jusqu'à différentes régions des complexes ventrobasal et centromédian du thalamus somatosensoriel où il fera contact avec le troisième neurone ou neurone tertiaire (Fig.1). Il est important de noter que le neurone secondaire reçoit aussi des contacts synaptiques en passant dans différentes régions du tronc cérébral dont la substance grise périaqueducale (SGPA) et les noyaux du raphé (*nucleus raphe magnus* (NRM)) qui est un centre important de modulation de la douleur. Ainsi la voie médullaire se divise en deux voies principales : la voie spinothalamique latérale et la voie spinothalamique réticulaire (ou spinothalamique médiane). La voie des cordons postérieurs (lemniscale) est principalement responsable de l'acheminement des informations non nociceptives en provenance des fibres A β . Néanmoins, des études anatomiques et cliniques (Gildenberg 2001; Palecek and Willis 2003) ont démontré que la région médiane des cordons postérieurs joue un rôle important dans le transport des afférences viscérales dont les signaux nociceptifs proviennent des viscères.

La majorité des informations nociceptives cheminent par le quadrant antérolatéral de la moelle épinière. Nous pouvons diviser ces voies nociceptives en deux principaux faisceaux : le faisceau spinothalamique latéral et le faisceau spinoréticulaire. Le faisceau spinothalamique latéral est, comme son nom l'indique, en position latérale et se projette directement vers les noyaux thalamiques latéraux du complexe ventrobasal (ventro-postero-latéral (VPL) et ventro-postéro-médian (VPM)). Les cellules de projection du faisceau spinothalamique, qui proviennent principalement des laminae I, IV, V et VI, projettent vers les noyaux du complexe ventrobasal controlatéral. Leurs champs récepteurs sont généralement controlatéraux

et circonscrits. Le faisceau spinoréticulaire est en position plus médiane. La majorité de ses afférences proviennent des laminae profondes VII et VIII et projette vers les noyaux médians du thalamus et certaines structures du tronc cérébral dont la substance grise périaqueducule et les noyaux du raphé (Willis 1985). Contrairement à la voie spinothalamique, la voie spinoréticulaire a des champs récepteurs très larges qui couvrent quelquefois l'ensemble du corps.

Les fibres de la voie spinothalamique ont des afférences rapides avec des champs récepteurs relativement précis qui se projettent vers les régions thalamiques puis corticales ayant des représentations somatotopiques précises. La voie spinothalamique possède donc des qualités nécessaires à la localisation et à la perception de l'aspect sensori-discriminatif de la douleur (Willis 1985).

Pour sa part, la voie spinoréticulaire projette des fibres dont les afférences ont des champs récepteurs plus larges, dont la majorité provient des fibres C lentes. Ces projections se font vers des régions du tronc cérébral, du thalamus et du cortex qui jouent des rôles dominants dans la mémoire et les émotions. Ces qualités en font la candidate type pour son implication importante dans la perception de l'aspect désagréable ou voie motivo-affective de la douleur.

2.10.1 Organisation du thalamus

Les neurones secondaires des voies spinothalamiques et spinoréticulaires projettent à leur tour vers les noyaux du thalamus où se situe le troisième neurone de la voie nociceptive. Nous pouvons diviser les noyaux thalamiques qui reçoivent les afférences des voies nociceptives en deux groupes : (i) les neurones du complexe ventrobasal et centromédian (CM) ou intralaminaires. Les noyaux du complexe ventrobasal reçoivent principalement leurs afférences en provenance de la voie spinothalamique et se projettent à leur tour vers le cortex somatosensoriel primaire et secondaire (S1, S2). Les noyaux centromédians reçoivent principalement leurs afférences de la voie spinoréticulaire et projettent à leur tour vers différentes structures du système limbique, dont l'amygdale.

Cette division simplifiée permet de comprendre comment, relativement tôt dans le système nerveux central, les différentes voies de la douleur se projettent vers des régions qui se spécialisent soit dans la composante sensori-discriminative (voie

spinothalamique), soit dans la composante motivo-affective (voie spinoréticulaire) de la douleur. Ainsi les informations nociceptives vont à la fois rejoindre des centres qui donnent de l'information sur les qualités sensorielles de la douleur dont sa localisation, son intensité et sa durée et d'autres centres qui font appel à la composante affective de l'expérience douloureuse, soit l'aspect désagréable de la douleur ou le danger que représente cette douleur pour l'organisme.

Le thalamus est un centre d'intégration des informations nociceptives qui joue un rôle déterminant dans la modulation de la douleur. L'utilisation des stimulations thalamiques comme approche analgésique dans des cas de douleurs complexes pour lesquelles aucun autre traitement n'était efficace en est une démonstration probante (Craig et al. 1994; Craig 2003).

Le neurone tertiaire conduit ensuite les informations nociceptives vers différentes régions du cortex somatosensoriel et certaines structures limbiques.

Chaque fois que l'un de ces trois neurones conduisant l'information nociceptive fait un contact synaptique, il y a intégration de l'information et celle-ci subit des influences inhibitrices ou excitatrices. Ce sont ces régions d'intégration qui sont les cibles de la plupart des médicaments antalgiques.

2.10.2 Cortex

Les dernières décennies ont été primordiales dans l'identification du rôle des régions corticales dans la douleur. Comme pour les noyaux du thalamus, nous pouvons simplifier la représentation des structures cérébrales entre celles qui reçoivent les afférences de la voie sensori-discriminative et celles qui les reçoivent de la voie motivo-affective.

Depuis les premières études d'imagerie cérébrale des régions impliquées dans la douleur par la tomographie par émission de positron (TEP) (Talbot et al. 1991; Coghill et al. 1994), plusieurs études ont confirmé l'implication de quatre principaux centres cérébraux impliqués dans la douleur : le cortex somatosensoriel primaire (aire S1 de Broca) dans la circonvolution post-centrale du lobe pariétal, le cortex somatosensoriel secondaire (S2) dans l'operculum pariétal, le cortex cingulaire antérieur (CCA) au niveau de la circonvolution du corps calleux et l'insula du lobe

du cortex insulaire (CI), qui se trouve sous le lobe temporal et frontal au niveau de la scissure de Sylvius.

Ces quatre structures, S1, S2, CCA et CI jouent un rôle majeur dans la perception douloureuse. Malgré le fait que cette division soit réductionniste, il semble que les deux premières structures (S1 et S2) sont principalement impliquées dans la composante sensori-discriminative de la douleur, tandis que les deux suivantes (CCA et CI) sont plus impliquées dans la composante motivo-affective (Casey 2000; Rainville et al. 2000).

2.10.2.1 Le cortex somatosensoriel primaire (S1)

La voie spinothalamique, en provenance du complexe ventrobasal du thalamus se projette vers le cortex somatosensoriel primaire (S1) et secondaire (S2). Des lésions de S1 et S2 entraînent une perte de la capacité à identifier la localisation, l'intensité et la durée de stimulations nociceptives (Kenshalo and Douglas 1995; Casey 2000), ce qui confirme leur rôle de S1 et S2 dans la composante sensori-discriminative de la douleur. Cependant, il faut souligner que les lésions du cortex somatosensoriel peuvent parfois induire une hyperalgésie (Kenshalo and Douglas 1995). Ce phénomène s'expliquerait par la destruction de régions corticales excitatrices et/ou inhibitrices selon l'étendue de la lésion du cortex pariétal. Plusieurs travaux ont confirmé le rôle de S1 dans la composante sensori-discriminative de la douleur par la mise en évidence en imagerie fonctionnelle de sa capacité à isoler la composante nociceptive d'une stimulation (Bushnell et al. 1999).

2.10.2.2 Le cortex somatosensoriel secondaire (S2)

Bien qu'il semble moins spécifique que le cortex somatosensoriel primaire, le cortex somatosensoriel secondaire semble jouer un rôle dans la composante sensori-discriminative de la localisation et d'appréciation des qualités de la stimulation nociceptive malgré des champs récepteurs de dimension variables et généralement bilatéraux. Chez les patients ayant subi une hémisphérectomie, comme cela est parfois nécessaire dans la prise en charge de l'épilepsie partielle continue (syndrome de Rasmussen), la stimulation de la jambe controlatérale à la lésion produit une activation de S1 du même côté que la jambe stimulée, contrairement à une activation

controlatérale chez des sujets sains (Olausson et al. 2001). Cette réorganisation corticale met en lumière l'implication potentielle de réseaux entre le cortex somatosensoriel primaire S1 et le cortex somatosensoriel S2 et la plasticité globale du cortex somatosensoriel (Rainville et al. 2004).

2.10.2.3 La composante motivo-affective de la douleur

Le cortex cingulaire antérieur et l'insula sont deux régions du système limbique qui jouent un rôle dominant dans la composante motivo-affective de la douleur. De plus, avec leurs larges champs récepteurs pouvant couvrir l'ensemble du corps, le cortex cingulaire antérieur et l'insula participent aux sensations générales et intéroceptives du corps (Craig et al. 2000; Craig 2002).

2.10.2.3.1 Le cortex cingulaire antérieur (CCA)

De nombreuses études ont mis en évidence une participation importante du cortex cingulaire antérieur dans les stimulations douloureuses (Talbot et al. 1991; Vogt et al. 1993; Coghill et al. 1994; Kenshalo and Douglas 1995; Schnitzler and Ploner 2000). Les études cliniques chez des patients ayant subi des lésions du CCA ont mis en évidence un effet inhibiteur de cette région aussi bien pour des douleurs cliniques (Pillay and Hassenbusch 1992) qu'expérimentales (Talbot et al. 1995). Cette région du système limbique reçoit ses afférences de la voie médiane et joue un rôle déterminant dans la composante motivo-affective, comme par exemple, celles du côlon irritable, qui activent préférentiellement cette structure cérébrale (Chang et al. 2003).

2.10.2.3.2 Le cortex insulaire (CI)

Le cortex insulaire est un carrefour de nombreux réseaux corticaux, notamment avec des structures corticales classiquement associées à la douleur comme le cortex S1, S2 et le cortex cingulaire. L'insula établit plusieurs contacts avec d'autres structures limbiques comme l'amygdale et le cortex périrhinal. Chez les patients, la stimulation du complexe insulaire produit des sensations émotives inappropriées à la suite de stimulations nociceptives (Friedman and Murray 1986). La présence de neurones thermoréceptifs et nociceptifs a été clairement documentée

au niveau du cortex insulaire (Craig et al. 1996). Dans une étude sur l'illusion thermique de Thunberg consistant en une perception de douleur paradoxale au contact de barres tièdes et froides juxtaposées qui, prises individuellement, ne produisent que des sensations de chaud ou froid non douloureux, Craig et collaborateurs (Craig et al. 1996) ont mis en évidence que la douleur ressentie provient d'un phénomène de diminution de l'inhibition tonique des neurones nociceptifs par la représentation simultanée des deux températures (froid et chaud). Ce phénomène se produirait principalement dans l'insula et pourrait être impliqué dans certaines douleurs centrales (Morin et al. 2002) comme les brûlures ressenties par les patients présentant des lésions thalamiques (syndrome thalamique).

3 Les canaux sensibles aux protons (Acid Sensing Ion Channels (ASICs))

3.1 Introduction

Les perceptions sensorielles, la transduction et l'intégration par le système nerveux central chez les mammifères et d'autres espèces sont des processus médiés par des récepteurs cellulaires de surface. Les canaux ioniques « acid-sensing ion channel » (ASIC) semblent jouer un rôle majeur dans ce type de médiation.

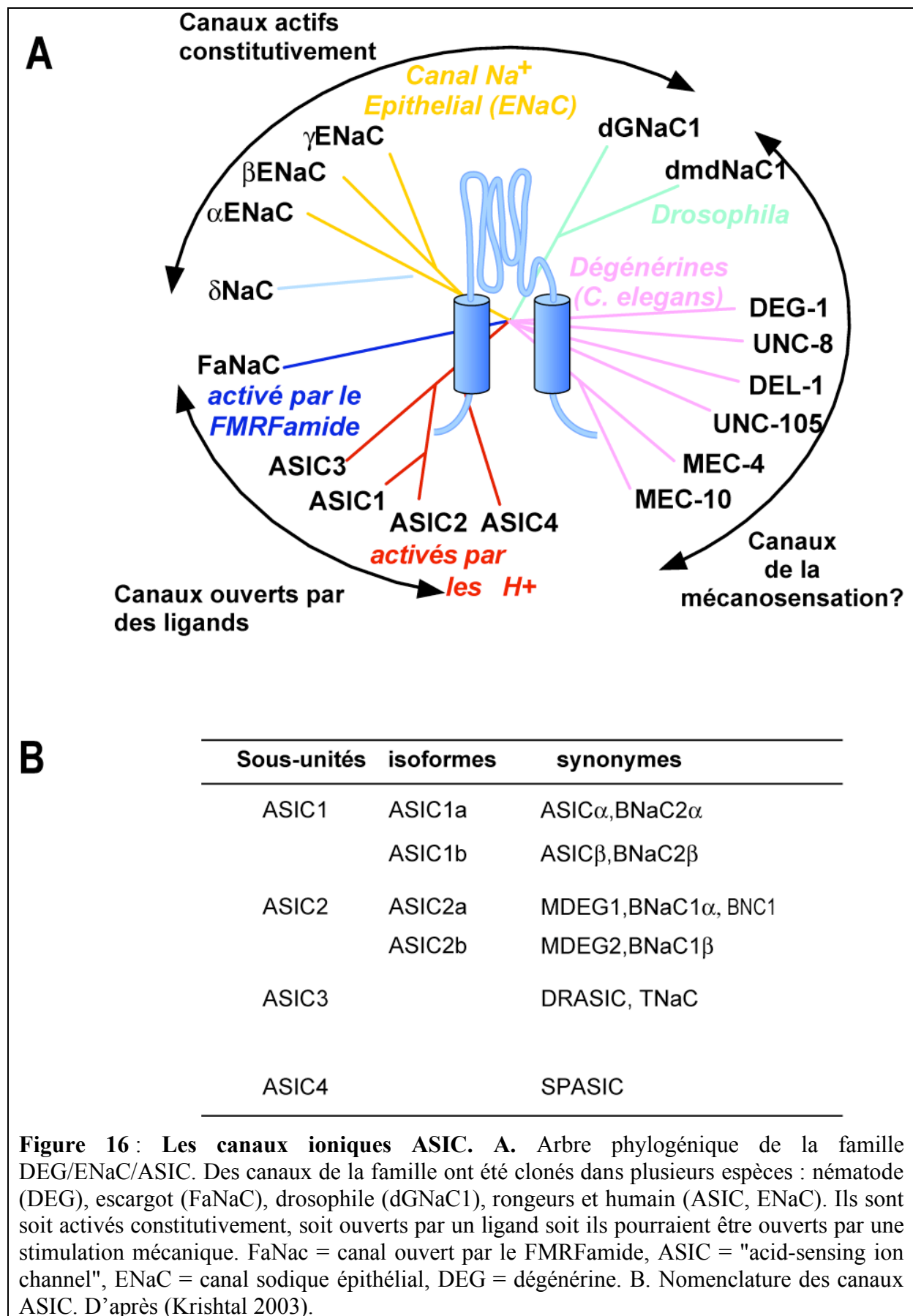
Comme décrit précédemment, les protons ont un effet majeur sur l'excitabilité neuronale : ils activent les neurones sensoriels en générant des courants dépolarisants et créent directement une sensation de douleur. Des récepteurs au proton, le plus simple des ligands, ont été clonés au sein du laboratoire : ce sont les canaux ioniques "acid-sensing ion channel" (ASIC) (Waldmann et al. 1997a). Il semble que leur fonction majeure dans le système nerveux périphérique soit celle de senseurs de l'acidose tissulaire douloureuse et notamment pendant l'inflammation. Les canaux ASIC sont l'objet de notre travail de recherche. Nous avons étudié le rôle de ces canaux ASIC dans le système nerveux central et pour l'un d'entre eux mis en évidence un effet non pas sur la perception douloureuse critique, mais plutôt sur l'absence de perception douloureuse, l'analgésie. La connaissance que nous avons des canaux ASIC est donc décrite dans cette partie, notamment sur leur structure, leurs caractéristiques électrophysiologiques, sur la régulation de leur activité à court terme et sur leurs interactions moléculaires avec des inhibiteurs spécifiques.

3.2 La famille des canaux ioniques ENaC/DEG/ASIC

Les canaux ioniques ASIC (aussi appelés ACCN) appartiennent à la superfamille des canaux sodiques ENaC/DEG (Waldmann and Lazdunski 1998). ENaC est le canal sodique épithélial de mammifère impliqué dans la réabsorption du sodium ainsi que dans la perception du goût salé (Barbry and Hofman 1997). Les dégénérines (DEG) sont les canaux ioniques impliqués dans la mécanosensation chez le nématode *C. Elegans* (Huang and Chalfie 1994; Garcia-Anoveros and Corey 1997). Elles furent isolées grâce à des mutations gain de fonction dans leurs gènes qui sont la principale cause de neurodégénération héréditaire. En effet, les DEG actives

constitutivement laissent pénétrer des cations, et donc de l'eau, en grande quantité dans la cellule ce qui entraîne la mort cellulaire par choc osmotique (Huang and Chalfie 1994). Des membres de la famille ENaC/DEG/ASIC ont été clonés dans d'autres espèces, par exemple le canal FaNaCh, sensible au peptide FMRFamide et qui est impliqué dans la neurotransmission chez l'escargot *Helix aspersa* (Lingueglia et al. 1995). Les gènes codants pour les canaux ASIC sont particulièrement bien conservés entre les espèces. D'un point de vue pharmacologique, les canaux de cette famille sont bloqués par l'amiloride, un agent diurétique. Les canaux ASIC ont été clonés chez les mammifères par homologie de séquence avec les dégénérines : ce sont des protéines d'une nouvelle branche phylogénique de la superfamille ENaC/DEG exprimées dans le système nerveux périphérique et le système nerveux central (Fig.16A).

Dans des systèmes hétérologues d'expression, les canaux ASIC sont indépendants du voltage et directement activés par les protons. Cette dernière observation est à l'origine de l'hypothèse que ces canaux ASIC soient impliqués dans la nociception liée à l'acidification extracellulaire dans le système sensoriel. Pour les canaux ASIC exprimés au niveau central, une hypothèse est qu'ils sont impliqués dans la transmission synaptique car la fente synaptique s'acidifie après relargage des neurotransmetteurs (Krishtal et al. 1987). Actuellement, six isoformes ont été clonées chez le Rat : ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a (MDEG pour « mammalian degenerin »), ASIC2b, ASIC3 (initialement DRASIC, pour « dorsal root ganglion ASIC »), et ASIC4 (Fig.16B) (Waldmann et al. 1996; Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b; Chen et al. 1998; Akopian et al. 2000; Grunder et al. 2000; Bassler et al. 2001). Chez les mammifères, les isoformes ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont exprimées dans le cerveau et la moelle épinière (Basilana et al. 1997; Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997b; Price et al. 2000; Baron et al. 2002b). Les isoformes ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a ASIC2b et ASIC3 sont retrouvées dans les neurones sensoriels. Les canaux ASIC3 sont plus spécifiques des ganglions spinaux, alors que l'isoforme ASIC4 est principalement exprimée au niveau central (Waldmann et al. 1996; Waldmann et al. 1997b; Chen et al. 1998; Grunder et al. 2000).



Les orthologues ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a et ASIC3 ont été clonés chez l'Homme. ASIC1a et ASIC1b seraient générés à partir de promoteurs alternatifs d'un même gène (Chen et al. 1998), alors que ASIC2a et ASIC2b sont *a priori* issus d'épissage alternatif à partir d'un même ARNm immature (Lingueglia et al. 1997).

La pharmacologie des canaux ASIC comprend des molécules non sélectives pouvant activer ou inhiber leurs courants quand elles sont appliquées à très fortes concentrations. Deux peptides récemment isolés à partir d'araignée et d'anémone de mer sont des bloqueurs sélectifs de haute affinité pour les canaux homotrimériques ASIC1a et homo- et hétérotrimériques ASIC3 (Diochot et al. 2004; Salinas et al. 2006). Le peptide d'anémone de mer APETx2 présente une structure commune avec les autres toxines d'anémone de mer qui modifient les propriétés d'ouverture des canaux sodiques et potassiques voltages-dépendants (Chagot et al. 2005). Ces nouveaux peptides qui sont d'excellents bloqueurs des canaux ASIC offrent des perspectives intéressantes pour l'étude du rôle fonctionnel des canaux ASIC dans l'hyperexcitabilité neuronale et le codage de l'information nociceptive.

3.3 Structure fonction des canaux ASIC

La topologie membranaire des canaux ASIC consiste en deux domaines transmembranaires connectés par une très large boucle extracellulaire riche en cystéine avec les extrémités N- et C-terminales intracellulaire (Saugstad et al. 2004). Dans le domaine N-terminal se trouvent des domaines impliqués dans le contrôle de la sélectivité du canal et de son ouverture (Coscoy et al. 1999; Bassler et al. 2001). La première partie de la boucle extracellulaire située après le segment M1 (résidus 63 à 185 d'ASIC1a) et plus variable que la seconde partie qui est très conservée (résidus 186 à 432). L'histidine 72 semble cruciale pour la sensibilité au pH (Baron et al. 2001) et se situe à proximité d'un domaine important pour la cinétique de désensibilisation (Coric et al. 2003). À proximité de la position 105 se trouve aussi un domaine régulant la sensibilité au pH et l'état d'inactivation du canal (Babini et al. 2002). La lysine en position 33 correspond au site de haute affinité pour l'inhibition sensible au Zn^{2+} (Chu et al. 2004). Les deux domaines riches en cystéine contiennent une histidine cruciale pour les effets d'activation du Zn^{2+} d'ASIC2a (Baron et al. 2001). La cystéine en position 193 et la cystéine en position 93 forment un pont dissulfure. La terminaison de la boucle extracellulaire, à proximité du segment transmembranaire

M1 contient le site dégénérine (Hong and Driscoll 1994; Champigny et al. 1998) et deux amino-acides essentiels pour le blocage calcium-dépendant d'ASIC1a (Paukert et al. 2004). Le site de sensibilité à l'amiloride et le filtre de sélectivité se situent dans le segment M2 et impliqueraient également M1 (Poet et al. 2001; Kellenberger and Schild 2002).

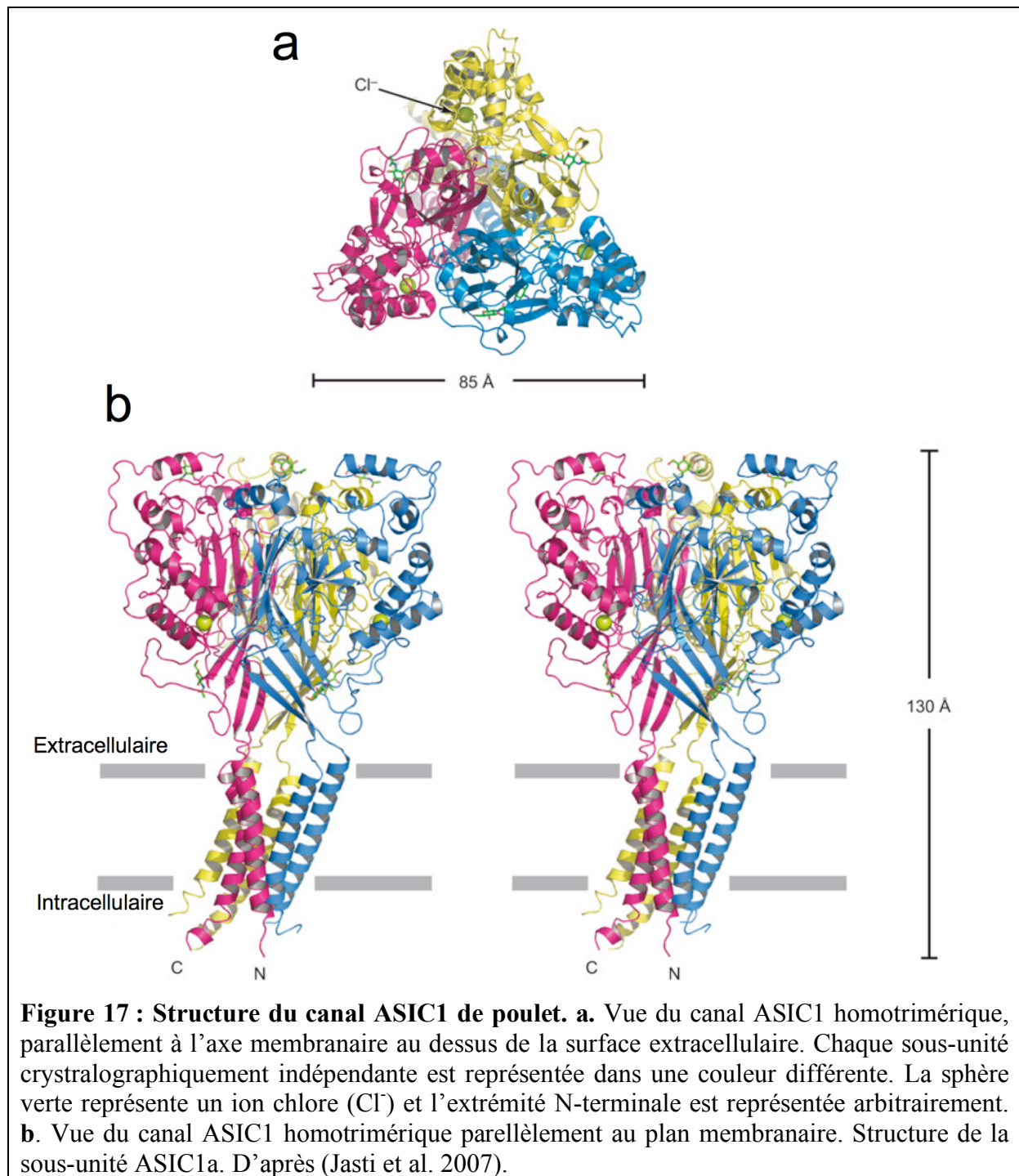
3.4 Architecture des canaux ASIC1a

3.4.1 Structure du canal ASIC1a

La récente publication de Jasti et al. (Jasti et al. 2007) nous permet d'entrevoir l'architecture des canaux ASIC. Cette étude cristallographique du canal ASIC1a de poulet révèle un assemblage trimérique. La forme des canaux ASIC1 évoque un calice avec un large domaine évasé et protubérant à 80Å au-dessus du plan membranaire, un mince domaine transmembranaire et une base en continuité comprenant les domaines N- et C-terminaux. Le domaine transmembranaire est composé des paires de longues hélices α appartenant à chacune des trois sous-unités. Dans la partie extracellulaire, chacune des hélices α se prolongent par un feuillet β plissé au sein du large domaine extracellulaire. Surmontant ces « articulations » entre les domaines transmembranaires et extracellulaires, la cristallographie du canal montre trois boucles extracellulaires bien ordonnées. La conformation de ces boucles extracellulaires suggère qu'elles aient un rôle majeur dans la régulation de la conformation du canal.

En forme d'entonnoir, le domaine extracellulaire trimérique se compose d'un cœur formé par trois larges feuillets β , de chacune des sous-unités et de 3 plus petits feuillets β et de trois hélices α . La mise en évidence de rapports étroits entre les sous-unités formant le canal est un argument supplémentaire soutenant un assemblage trimérique des sous-unités dans la constitution d'un canal fonctionnel.

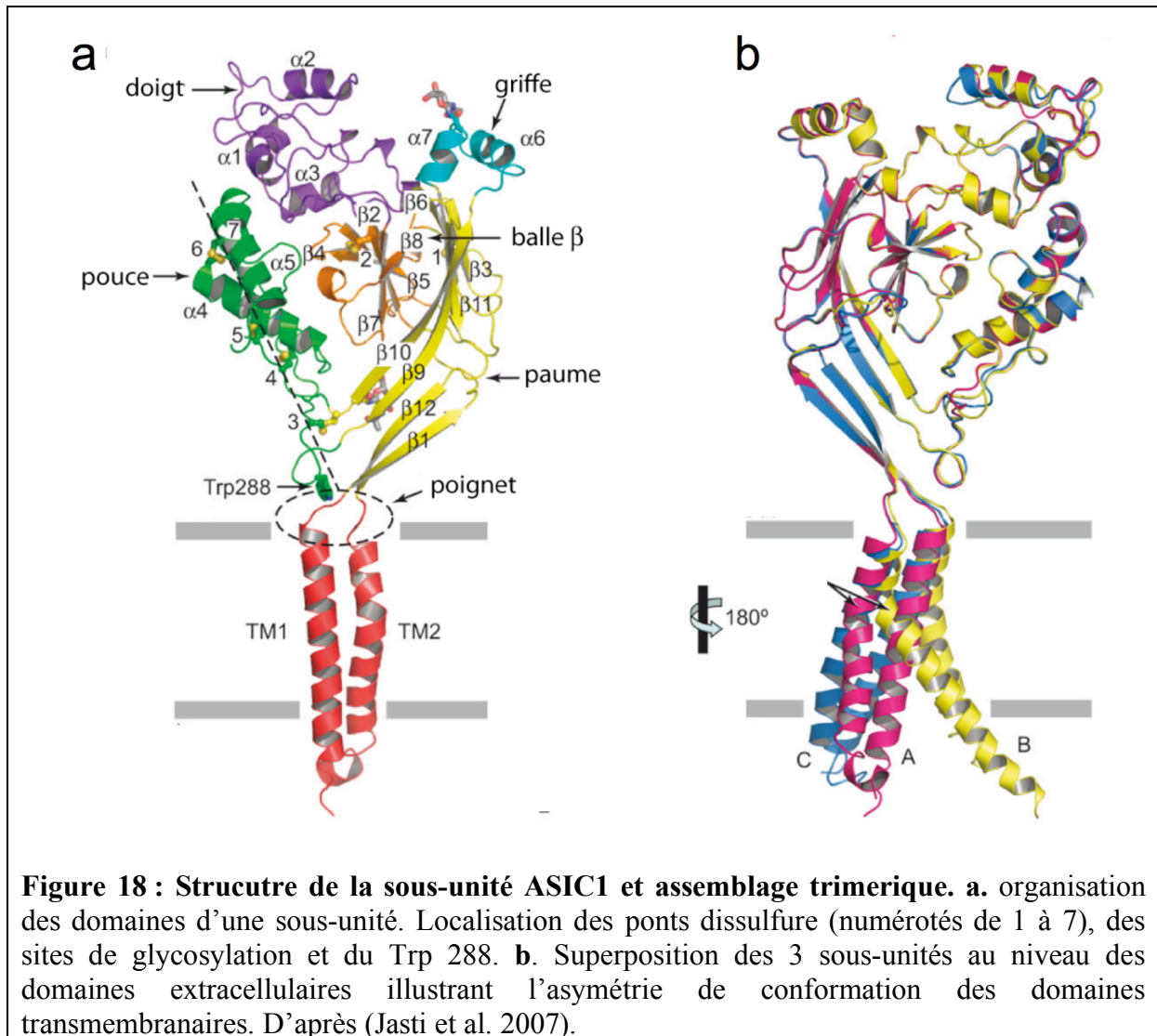
L'arrangement trimérique de ce canal se caractérise par un haut degré d'asymétrie au niveau de la région formée par les six hélices α même si cette analyse peut être biaisée par la troncation des extrémités N- et C-terminale dans ce cristal. Cette structure obtenue à pH acide représenterait la conformation désensibilisée du canal et de ce fait ne permet pas une étude approfondie du senseur de pH (Fig.17).



3.4.1.1 Structure de la sous-unité ASIC1

L'ensemble de la structure protéique d'ASIC1a ressemble à une main formant la partie extracellulaire et à un avant-bras, représenté par la partie transmembranaire, le poignet correspond à la jonction entre la partie extracellulaire et la partie transmembranaire du canal. Comme cela était attendu (Firsov et al. 1999), la région extracellulaire est stabilisée par 7 ponts dissulfure formés entre 14 résidus cystéine.

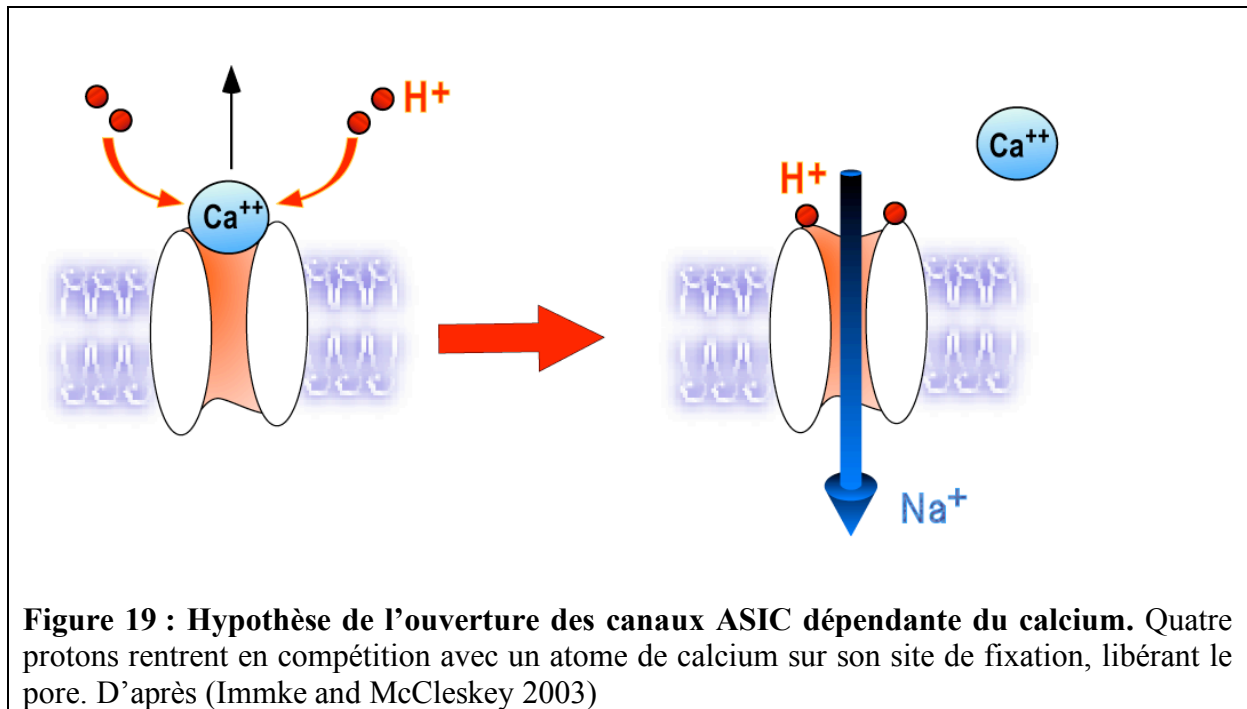
La structure confirme également les données électrophysiologiques qui suggèrent que le second domaine transmembranaire (Lingueglia et al. 1995; Schild et al. 1997; Kellenberger et al. 1999; Sheng et al. 2000) et qu'une séquence d'acide aminés précédant le premier domaine transmembranaire forment le pore ionique (Coscoy et al. 1999; Bassler et al. 2001) (Fig.18).



3.5 Structure et mécanismes d'ouverture/fermeture des canaux ASIC

Les six isoformes ASIC partagent la même topologie structurale, comprenant deux domaines transmembranaires qui encadrent une large boucle extracellulaire. Les extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires. Les différentes isoformes sont de tailles équivalentes (513 à 563 acides aminés) et s'organisent en homotrimères ou hétérotrimères pour former un canal fonctionnel, comme cela a été montré pour le canal ASIC1a qui a été cristallisé chez le poulet (Fig.17) (Waldmann et al. 1996; Bassilana et al. 1997; Garcia-Anoveros and Corey 1997; Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b; Chen et al. 1998; Coscoy et al. 1998; Grunder et al. 2000; Jasti et al. 2007). Des études de mutagenèse dirigée des canaux ENaC et FaNaCh montrent que la formation du pore des canaux de la famille implique les deux domaines transmembranaires. Le filtre de sélectivité du pore implique la région précédant le premier domaine transmembranaire : les mutations I19P, F20S et T25K chez ASIC2 et T26K chez ASIC3 rendent ces canaux moins sélectifs pour le Na⁺. La dépendance au pH implique au moins les deux régions qui précèdent les deux domaines transmembranaires. En effet, les mutations F20S, T25K et G430 induisent une augmentation de la sensibilité au pH (Coscoy et al. 1999). Le domaine précédant le deuxième domaine transmembranaire est également impliqué dans le contrôle de l'ouverture/fermeture des canaux ASIC car la mutation du résidu G430 est une mutation gain de fonction (Champigny et al. 1998). Ces études de mutagenèse sont à corrélérer à des études électrophysiologiques qui proposent que l'ouverture des canaux ASIC3 soit provoquée par la levée de l'inhibition calcique par les protons (Immke and McCleskey 2003). Le calcium bloquerait l'entrée du pore en se liant à un site adjacent, qui pourrait être avant le deuxième domaine transmembranaire selon les études de mutagenèse. En situation physiologique, le calcium jouerait le rôle de pivot dans le contrôle de l'état d'activation des canaux ASIC. En conformation fermée, au repos, ils auraient un effet stabilisateur et accéléreraient le retour à l'état fermé après la phase de désensibilisation. En situation d'acidose, les protons rentreraient en compétition avec le calcium pour le même site de liaison, catalysant leur relargage et libérant le pore par changement conformationnel lors de l'activation (figure 19B). Cette structure suggère également

que le calcium pourrait jouer un rôle de stabilisateur des résidus acides (carboxy-carboxyliques) au repos.



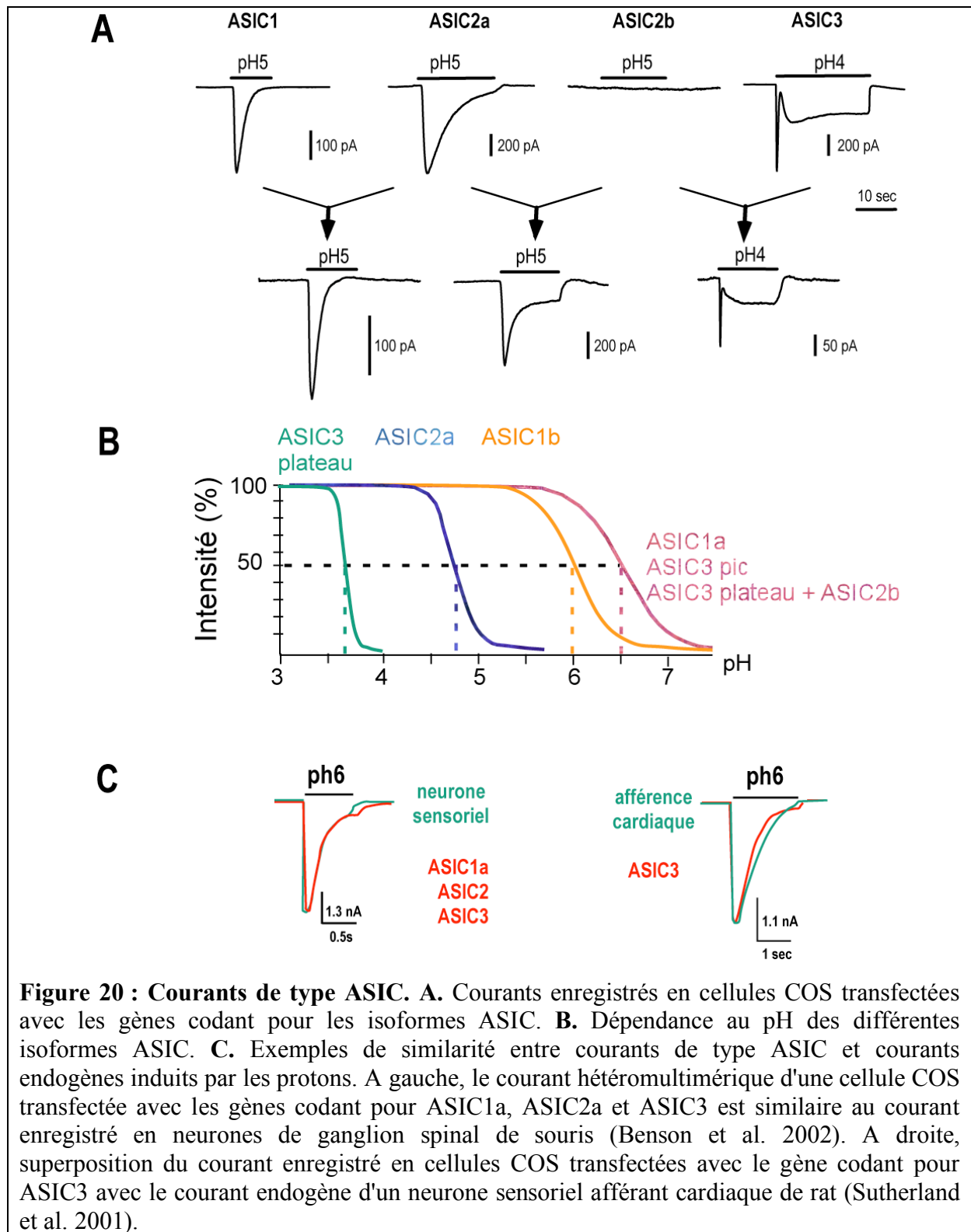
L'idée que l'ouverture des canaux ASIC se réaliserait ainsi sans changement de conformation est ici confortée par le fait que cette étape soit indépendante de la température, contrairement à la désensibilisation qui se réaliserait *via* un changement de conformation du canal (Immke and McCleskey 2003). Néanmoins, une autre étude révèle que le canal ASIC1a est activé par les protons *via* un changement de conformation (Adams et al. 1998). Concernant les autres membres de la famille ENaC/DEG/ASIC, une étude d'exploration du pore du canal FaNaC par remplacement systématique des résidus aminés en cystéines a permis de mettre en évidence un modèle différent d'ouverture/fermeture pour les canaux de la famille. L'ouverture/fermeture du canal FaNaC s'effectuerait ici par changement conformationnel : la porte du canal à proprement dit serait une constriction au niveau de la face interne du pore. La flexibilité de cette région suggère que la liaison au FMRFamide induit l'ouverture du canal (Poet et al. 2001). Ainsi, les membres de la famille ENaC/DEG/ASIC peuvent présenter des mécanismes différentes.

3.6 Les courants de type ASIC

3.6.1 Les courants de type ASIC en systèmes hétérologues

Les caractéristiques biophysiques des courants générés par les canaux ASIC ont été étudiés en système hétérologue (Fig.20A & B), souvent des cellules COS ou des ovocytes de Xénope. Le canal ASIC1a est préférentiellement perméable au sodium mais laisse aussi passer du potassium ($P_{Na^+}/P_{K^+} = 13$), du calcium ($P_{Na^+}/P_{Ca^{2+}} = 2.5$) et des protons ($P_{Na^+}/P_{H^+} = 0.8$). Le canal est inhibé pour de fortes concentrations en calcium externe (~ 10 mM) (Waldmann et al. 1997b). La sensibilité au pH extracellulaire, les cinétiques d'activation et d'inactivation sont des propriétés clés qui permettent de définir et de caractériser les canaux ASIC qui ne sont pas voltage-dépendant. ASIC1a s'active lorsque le pH extracellulaire diminue rapidement de 7,4 à des valeurs de pH inférieures à 6,9 (pH de demi-activation : $pH_{0,5act}$ 6,2-6,8) (Waldmann et al. 1997b; de Weille and Bassilana 2001; Sutherland et al. 2001; Chen et al. 2006b). Les canaux ASIC génèrent des courants d'activation et désactivation rapide ($\tau_{act} := 5,8-13,7$ ms et $\tau_{inact} = 1,2-4$ s à pH6) (Bassler et al. 2001; Sutherland et al. 2001). Le variant d'épissage ASIC1b génère des courants plus sélectifs pour le sodium caractérisés par un $pH_{0,5act}$ de 5,1-6,2 ms (Chen et al. 1998; Benson et al. 2002) avec des cinétiques rapides ($\tau_{act} = 9,9$ ms et $\tau_{inact} = 0,9-1,7$ s à pH6) (Bassler et al. 2001; Benson et al. 2002). Sa différence électrophysiologique majeure avec ASIC1a se rapporte à sa sensibilité au calcium externe : ASIC1b y est moins perméable et moins sensible (Chen et al. 1998). Les canaux ASIC2a sont activés à des valeurs de pH en dessous de 6 ($pH_{0,5act} = 4.1-5$) (Champigny et al. 1998; Baron et al. 2001; de Weille and Bassilana 2001). Le canal ASIC2a présente des propriétés cinétiques différentes en comparaison des autres canaux ASIC, il s'active et se désensibilise plus lentement ($\tau_{inact} = 3,3-5,5$ s à pH 5) (Lingueglia et al. 1997; de Weille and Bassilana 2001). En présence d'un pH extracellulaire acide compris entre 5,0 et 6,7, les courants ASIC3 présentent les cinétiques d'activation et d'inactivation les plus rapides ($\tau_{act} < 5$ ms et τ_{inact} autour de 0,4 à pH 6). Les courants ASIC3 ont une cinétique d'inactivation biphasique avec une phase rapide de pH 0,5 à 6,5 suivi d'une phase soutenue de $pH_{0,5act}$ à 3,5-4 qui ne s'inactive pas. Cette caractéristique des courants ASIC3 pourrait être associée à son rôle dans la perception de l'acidité tissulaire et de la douleur non

adaptative qui en résulte (Bevan and Yeats 1991; Reeh and Steen 1996; Babinski et al. 1999).



ASIC2b, qui n'exprime pas de courant spontané, s'associe à d'autres sous-unités ASIC comme ASIC1a, ASIC2a et ASIC3 en conformation hétérotrimérique.

Les courants qui en résultent ont des propriétés pharmacocinétiques particulières (Lingueglia et al. 1997; Hesselager et al. 2004). Les associations hétéromériques augmentent la diversité fonctionnelle des courants ASIC (Bassilana et al. 1997; Babinski et al. 1999). La formation d'hétérodimères ASIC3/ASIC2b crée un courant similaire avec une phase de plateau de $\text{pH}_{0.5\text{act}} = 6.5$ (Lingueglia et al. 1997). ASIC4 ne présente pas de courant propre et ne modifie pas les courants des autres isoformes (Grunder et al. 2000; Grunder et al. 2001).

3.6.2 Analogie avec les courants endogènes induits par les protons

Plusieurs résultats expérimentaux révèlent que la plupart des courants endogènes rapides induits par les protons sur les neurones sensoriels sont produits par les canaux ASIC. D'abord, les canaux ASIC exprimés en systèmes hétérologues génèrent des courants aux propriétés biophysiques et pharmacologiques similaires à ces courants endogènes (Fig.20C) (Waldmann et al. 1996; Waldmann et al. 1997b; Chen et al. 1998; Waldmann and Lazdunski 1998; Sutherland et al. 2001; Benson et al. 2002). Cela a été montré à plusieurs reprises : (i) au niveau des nocicepteurs cardiaques de rat, le courant endogène induit par l'acidité en situation d'ischémie est identique au courant ASIC3 enregistré en système hétérologue (Sutherland et al. 2001), (ii) chez la souris, la formation d'hétéromultimères comprenant les canaux ASIC1a, ASIC2a et ASIC3 génère des courants aux mêmes propriétés biophysiques que les courants endogènes (Fig.30C) (Benson et al. 2002). Ensuite, les canaux ASIC exprimés en systèmes hétérologues sont activés dans la gamme des pH responsables de courants endogènes de neurones sensoriels : ainsi, les fibres C sont activées dès pH 6.9 (Steen et al. 1992), lorsque les canaux homomérique ASIC1a et hétéromériques ASIC3/ASIC2b commencent à s'ouvrir (Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997b). Enfin, cette analogie entre courants endogènes et courants produits par les canaux clonés est confirmée par l'utilisation d'outils pharmacologiques : (i) l'application sur les neurones de rat de la toxine de mygale PcTx1 qui est spécifique du canal ASIC1a homomérique abolit une partie des courants endogènes (Escoubas et al. 2000; Baron et al. 2002a), (ii) l'inhibition par des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) des courants générés par ASIC1a et

ASIC3 exprimés en cellules COS a permis de discerner la formation d'hétéro- et d'homomères ASIC endogènes au sein des neurones sensoriels (Voilley et al. 2001).

3.7 Distribution tissulaire

Les études en hybridation *in situ* et les études électrophysiologiques ont permis la localisation cellulaire des canaux ASICs dans le système nerveux central et périphérique où ils sont *quasi* exclusivement exprimés. Alors que la composition exacte des canaux ASIC dans les neurones natifs n'est pas toujours parfaitement déterminée, les sous-unités ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont exprimées de manière abondante dans le cerveau (Waldmann et al. 1996; Bassilana et al. 1997; Waldmann et al. 1997b; Wemmie et al. 2002; Alvarez de la Rosa et al. 2003) et dans les neurones de la moelle épinière (Chen et al. 1998; Babinski et al. 1999; Akopian et al. 2000; Grunder et al. 2000; Wu et al. 2004). ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont particulièrement exprimés dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le cervelet, le striatum, l'habenula, l'amygdale et le bulbe olfactif (Bassilana et al. 1997; Garcia-Anoveros and Corey 1997; Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997b; Baron et al. 2002a; Wemmie et al. 2003; Coryell et al. 2007). Dans les ganglions spinaux, ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b et ASIC3 sont prédominants dans les petits neurones (Krishtal and Pidoplichko 1981a; Bevan and Yeats 1991; Lingueglia et al. 1997; Chen et al. 1998; Olson et al. 1998; Voilley et al. 2001; Alvarez de la Rosa et al. 2002; Ugawa et al. 2005) alors que les ASIC2a est présent uniquement dans les neurones sensoriels de moyen et de grand diamètre (Garcia-Anoveros et al. 2001; Alvarez de la Rosa et al. 2002). Les canaux ASIC3 sont présents dans les mécanorécepteurs de large diamètre et dans les petits nocicepteurs (Price et al. 2001; Voilley et al. 2001). Les sous-unités ASIC3 sont également retrouvés dans les testicules, le poumon et l'os (Ishibashi and Marumo 1998; Babinski et al. 1999; Jahr et al. 2005). La présence d'ARNm d'ASIC1a, 2a, 3 et 4 a été décrite dans la rétine (Ettaiche et al. 2004; Lilley et al. 2004; Ettaiche et al. 2006). ASIC4, qui n'est pas activable par le pH acide est exprimé massivement dans l'hypophyse mais est aussi présent dans le cerveau, la moelle épinière et l'oreille interne (Grunder et al. 2000). De faibles niveaux d'ARNm d'ASIC4 ont également été identifiés dans les ganglions spinaux (Akopian et al. 2000).

3.8 Rôles des canaux ASIC

L'expression des canaux ASIC par les nocicepteurs suggèrent un rôle prédominant dans la douleur de l'inflammation tissulaire (Krishtal and Pidoplichko 1981b; Bevan and Yeats 1991; Waldmann et al. 1996; Olson et al. 1998; Price et al. 2001; Chen et al. 2002; Krishtal 2003; Jones et al. 2004; Ugawa et al. 2005). Les transcrits d'ASIC1a sont retrouvés au niveau des nocicepteurs des ganglions spinaux et les médiateurs de l'inflammation, comme le NGF, l'IL-1, la sérotonine et la bradykinine, entraînent une augmentation de la transcription des ASIC *in vivo* ainsi qu'une augmentation de leur activité enregistrée sur des neurones fraîchement dissociés (Voilley et al. 2001; Mamet et al. 2002). De plus, des concentrations thérapeutiques d'AINS comme l'ibuprofène, le furofène ou l'aspirine inhibent directement les courants ASIC1a et ASIC3 ce qui pourrait contribuer à leurs effets analgésiques (Voilley et al. 2001). De plus, les AINS suppriment la douleur causée par l'inflammation acide chez l'Homme (Jones et al. 2004). Dans les neurones sensoriels des afférences cardiaques mais aussi des neurones des ganglions spinaux, les courants ASIC sont responsables de la génération de potentiels d'action en réponse à une acidification du milieu extracellulaire. Ce type de réponse s'observe dans l'ischémie myocardique. ASIC3, qui représente le senseur majeur de l'acidité myocardique avec une capacité à s'ouvrir à pH 7, acidification observée dans les premières minutes qui suivent une ischémie myocardique, serait le senseur de cette acidification responsable de la douleur aigüe de l'infarctus du myocarde (Immke and McCleskey 2001).

Le rôle d'ASIC3 dans la douleur est également montré à travers l'étude du comportement des souris invalidées pour le gène ASIC3.

3.8.1 Les souris KO ASIC3

Deux souches de souris invalidées pour le gène codant pour ASIC3 ont été générées : l'une avec un fond génétique de souris C57/B6 par Price et collaborateurs (Price et al. 2001) et l'autre sur fond génétique de souris CD1 par Chen et collaborateurs (Chen et al. 2002). Les souris C57/B6 mutées présentent des altérations des sensations mécaniques, thermiques et de la perception de stimuli acides.

La diminution de la sensibilité à l'acidité se traduit à différents niveaux : (i) directement au niveau des neurones sensoriels dont la sensibilité au pH est altérée, (ii) au niveau d'une sous-population de fibres C en explant nerf/peau dont la fréquence des potentiels d'action est largement amoindrie à pH 5, (iii) au niveau de l'animal entier où les tests comportementaux révèlent une diminution de l'hyperalgésie mécanique musculaire secondaire consécutive à l'acidose tissulaire (par sensibilisation centrale) sans que cela ait pu être observé au niveau cutané (Price et al. 2001). Il existe donc une bonne corrélation entre la diminution de la sensibilité au pH des neurones en culture, la diminution de la fréquence de décharge des fibres C isolées et la réduction de l'hyperalgésie mécanique secondaire à l'acidose. Cela suggère que l'activité électrique conférée par le canal ASIC3 pourrait être suffisante pour induire les modifications post-traductionnelles et/ou transcriptionnelles responsables de la sensibilisation mécanique des nocicepteurs au cours de l'inflammation. Il existe néanmoins un paradoxe car la perte du canal ASIC3 n'entraîne pas de modification de la perception directe de l'acidose *in vivo*. Cela signifie soit que le rôle d'ASIC3 n'est pas prédominant dans la perception primaire de l'acidose, ce qui est surprenant car ce canal est activé pour de faibles variations de pH et rend compte de plusieurs courants endogènes (Waldmann et al. 1997b; Sutherland et al. 2001; Voilley et al. 2001) soit qu'ASIC3 est effectivement un senseur primaire de l'acidose mais que cette fonction aiguë est masquée par l'activation des autres isoformes ASIC toujours en présence. Cette fonction pourrait alors mieux s'illustrer dans les étages vertébraux où ASIC3 est prédominant comme au sein des nocicepteurs cardiaques. A ce niveau, ASIC3 est en effet fortement suspecté d'être le senseur primaire de l'acidose consécutive à une ischémie cardiaque (Benson et al. 1999). Cette hypothèse introduit l'importance de la stoechiométrie des isoformes ASIC dans la formation des courants sensibles à l'acidose. Quoiqu'il en soit, la capacité du canal ASIC3 à exciter les neurones sous l'effet des protons de manière durable et intense est mise en valeur vis-à-vis des autres isoformes ASIC. Une telle capacité à créer une situation hyperalgésique peut s'expliquer par le fait que son courant présente une cinétique de réactivation rapide et une phase soutenue (Waldmann et al. 1997b; Sutherland et al. 2001). Concernant la mécanosensation, l'absence d'ASIC3 a un effet contradictoire : la sensibilité des fibres A β à adaptation rapide est augmentée alors que celle des fibres A δ est diminuée. Ceci suggère

qu'ASIC3 agit au sein de complexes hétéromultimériques mécanosenseurs différents dans ces deux types cellulaires. Les animaux mutants ont également une déficience de l'encodage des hautes températures par les fibres C polymodales ($> 52.5^{\circ}\text{C}$). Ce phénotype est inattendu car les canaux ASIC semblent plutôt être potentialisés par le froid (Askwith et al. 2001)). Ainsi, les auteurs suggèrent sur ce point une interaction fonctionnelle avec les canaux de la famille TRP (TRPV1, TRPV2). Cette étude permet de conclure que le canal ASIC3 est un acteur de l'hyperalgésie acide, de la nociception thermique ainsi que du toucher et de la nociception mécanique. Néanmoins, l'hypothèse que le canal ASIC3 est un senseur primaire de l'acidose ne peut être complètement écartée. L'étude de la deuxième souche de souris invalidées pour le gène qui code ASIC3 est contradictoire. En effet, les animaux CD1 mutés ne présentent non pas une diminution mais une augmentation des réponses comportementales aux stimuli mécaniques, thermiques ou acides de haute intensité (Chen et al. 2002). Clairement, le phénotype de ces souris ne met pas en évidence la fonction directe de perception d'un stimulus sensoriel, mais suggère une fonction plus générale pour ASIC3 dans la modulation des influx nerveux. L'idée sous-jacente semble donc être que la haute stimulation neuronale conférée par ASIC3 entraîne une répression du traitement des stimuli au niveau central *via* des systèmes régulateurs tel que le « gate control » (Melzack and Torgerson 1971). L'absence d'ASIC3 lèverait cette inhibition et les animaux seraient alors plus sensibles. Les résultats opposés des deux études ne sont pas évidents à réconcilier. Si le point commun entre les deux est que le canal ASIC3 est capable d'exciter fortement et durablement les neurones sensoriels, cette fonction est d'un côté activatrice et de l'autre inhibitrice. Il est possible que l'utilisation de souches de souris différentes puisse expliquer cette opposition : en effet, toutes les souches de souris ne présentent pas la même sensibilité à la douleur et l'inactivation d'un gène entraîne souvent une modification plus large du fond génétique de l'animal. Il a ainsi été montré que la souche C57/B6, qui est l'une des souches les plus utilisées pour les études d'invalidation génique, présente une sensibilité basale à la douleur des plus basses (Mogil and Grisel 1998). Il est donc envisageable que l'absence du canal ASIC3 génère des phénotypes qui sont influencés par le fond génétique des souris. Nous pouvons alors imaginer que chaque souche révèle une facette de la fonction du canal. Si l'on réunit les deux phénotypes, ASIC3 pourrait posséder d'abord une fonction excitatrice

dans la perception acide et/ou mécanique puis ensuite inhibitrice, indirecte et indépendante de la nature des stimuli si son activation devient trop importante.

Les sous-unités ASIC1a et ASIC2a sont exprimées dans les neurones de ganglion spinal ainsi qu'au niveau des ganglions sympathiques qui innervent l'estomac. Dans les maladies du tube digestif proximal, comme l'ulcère gastrique, les propriétés biophysiques de ces canaux sont modulées suggérant une contribution de ces canaux dans la chémosensation et la chémonociception (Sugiura et al. 2005).

Plus récemment, les canaux ASIC1a, dont l'expression dans le système nerveux central est augmentée par l'IL1- β , une cytokine qui joue un rôle crucial dans les dommages neuronaux dus à la neurodégénérescence et dont les taux sont augmentés lors d'inflammation du SNC, ont été impliqués dans les phénomènes inflammatoires observés dans la sclérose en plaque (Friesse et al. 2007).

3.8.2 Les souris KO ASIC2a

Les souris invalidées pour le gène codant ASIC2a présentent une déficience de la mécanosensation (Price et al. 2000). Les expériences d'étirement sur explants nerf/peau issus de ces souris indiquent une baisse de la sensibilité mécanique de fibres A β à adaptation rapide. Cet effet est caractérisé par une augmentation du seuil d'activation mécanique et une diminution de la fréquence des décharges de potentiels d'action. Un point intéressant est que l'absence du canal ASIC3 provoque le phénotype inverse dans ces mêmes fibres (Price et al. 2001). Il est alors possible d'imaginer une collaboration entre les deux canaux pour médier la mécanosensation dans ces fibres : ceux-ci seraient intégrés dans le même complexe mécanotransducteur. Dans ce complexe, ASIC2a serait le canal mécanosensible alors qu'ASIC3 y serait une sous-unité modulatrice inhibitrice. ASIC3 agirait en diluant le nombre de sous-unité ASIC2a mécanosensibles dans les complexes. La perte d'ASIC2a entraînerait alors la perte de la sensibilité mécanique correspondante et celle d'ASIC3 une augmentation. Un phénotype similaire de perte de sensibilité, beaucoup moins prononcé, est observé pour les fibres A β à adaptation lente. Notons qu'aucune différence n'est observée avec le test mécanique classique des filaments de von Frey, suggérant que l'implication d'ASIC2a dans le toucher est spécifique d'un type de stimulation mécanique comme l'étirement, et/ou est minoritaire. La réponse au pH des neurones en culture ou bien des fibres en explants de peau est inchangée

vis-à-vis du phénotype sauvage (Price et al. 2000). La fonction d'ASIC2a dans la mécanosensation est en accord avec la parenté des canaux ASIC avec les dégénérines du nématode, et sa dépendance au pH étant très basse ($pH_{0.5} = 4.8$), il est possible que ce canal puisse être activé par d'autres stimuli.

3.8.3 Les souris KO ASIC1a

Il a été proposé que les canaux ASIC exprimés au sein du système nerveux central modulent l'activité synaptique (Baron et al. 2001; Baron et al. 2002b; Alvarez de la Rosa et al. 2003). En effet, le contenu des vésicules synaptiques est acide et leur relargage ferait transitoirement chuter le pH de la fente synaptique (Krishtal et al. 1987). En culture primaire de neurones d'hippocampe, ASIC1a est détecté au niveau synaptique (Alvarez de la Rosa et al. 2003; Wemmie et al. 2003). Les souris invalidées pour le gène qui code ASIC1a subissent une perturbation de la potentialisation à long terme, attribuée à une réduction de l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs couplée à une diminution de l'activation du récepteur synaptique au glutamate NMDA au cours de stimulations haute-fréquence. D'un point de vue fonctionnel, cela se traduit chez les souris par des problèmes mnésiques et d'apprentissage (Wemmie et al. 2002). Le phénotype central dû à la perte d'ASIC1a est relativement clair et révèle l'importance de ce canal dans les mécanismes généraux de la neurotransmission. ASIC1a pourrait donc être ciblé pour le traitement médical des troubles mnésiques bien que les effets observés sur le KO soient plutôt faibles. L'analyse comportementale des souris mutantes pour le canal ASIC1a vis-à-vis de la nociception est sommaire (Wemmie et al. 2003). Néanmoins, il a été montré d'un point de vue électrophysiologique que l'absence du canal ASIC1a dans les neurones sensoriels de ces souris modifie la sensibilité aux neuropeptides de la famille FMRFamide (Xie et al. 2003). Cependant, les données issues des études de souris invalidées pour les sous-unités des canaux ASIC suggèrent un rôle majeur d'ASIC3 et non d'ASIC1a dans la perception de l'acidose tissulaire musculaire dans des modèles d'hyperalgésie mécanique induite par l'inflammation ou par des injections intramusculaires acides répétées.

Au cours de l'ischémie cérébrale, l'acidose tissulaire active les canaux ASIC1a perméables au calcium et ainsi induit des dommages neuronaux (Yermolaieva et al. 2004; Gao et al. 2005). L'inactivation du gène ASIC1a chez la Souris et le venin de la

mygale *Psalmopeus Cambodgei* contenant PcTx1, comme induisent une neuroprotection accrue (Xiong et al. 2004; Benveniste and Dingledine 2005).

Dans un modèle de douleur inflammatoire périphérique, Duan et collaborateurs (Duan et al. 2007) suggèrent que l'augmentation du signal calcique par activation d'ASIC1a dans les neurones de la corne dorsale induit par l'inflammation périphérique contribue à l'augmentation de l'expression d'ASIC1a qui est à son tour responsable de l'hypersensibilité des neurones de la corne dorsale et de la douleur inflammatoire. Ainsi, un blocage spécifique des canaux ASIC1a perméables au calcium pourrait avoir une action antinociceptive lors de la sensibilisation de la moelle épinière par l'inflammation.

Plus récemment, Coryell et collaborateurs (Coryell et al. 2007) ont décrit chez la souris ASIC1a^{-/-} une diminution du conditionnement par la peur qui serait due à un défaut d'apprentissage au niveau de l'amygdale. Chez ces souris, une diminution de la LTP a été également rapportée précédemment (Wemmie et al. 2002). De plus, chez les souris surexprimant ASIC1a, ces phénomènes d'apprentissage comportementaux sont augmentés. Ces résultats suggèrent un rôle modulateur du canal ASIC1a dans le circuit neuronal de la peur qui serait indépendant de son contrôle de la plasticité synaptique (Wemmie et al. 2002) et aussi l'implication potentielle d'ASIC1a dans diverses pathologies psychiatriques.

Les souris ASIC1a^{-/-} présentent également une sensibilité diminuée à l'inflammation neuronale dans un modèle expérimental de sclérose en plaque (Friesse et al. 2007) et sont par conséquent moins déficientes que les souris sauvages soumises aux mêmes conditions expérimentales. Ceci semble en rapport avec une résistance accrue à la dégénérescence axonale observée dans cette maladie. De plus dans ce modèle, l'amiloride qui bloque non sélectivement les canaux ASIC semble avoir un effet neuroprotecteur, ce qui suggère que des bloqueurs spécifiques d'ASIC1a pourraient diminuer l'atteinte axonale dans la sclérose en plaque et les neuromyérites aiguës post-infectieuses chez l'Homme.

3.9 Pharmacologie des canaux ASIC

Le peptide FMRFamide isolé chez le mollusque (n'existe pas chez les mammifères), ainsi que le NPSF et le NPFF sont largement exprimés dans le système nerveux central et particulièrement dans la moelle épinière (Devillers et al. 1995;

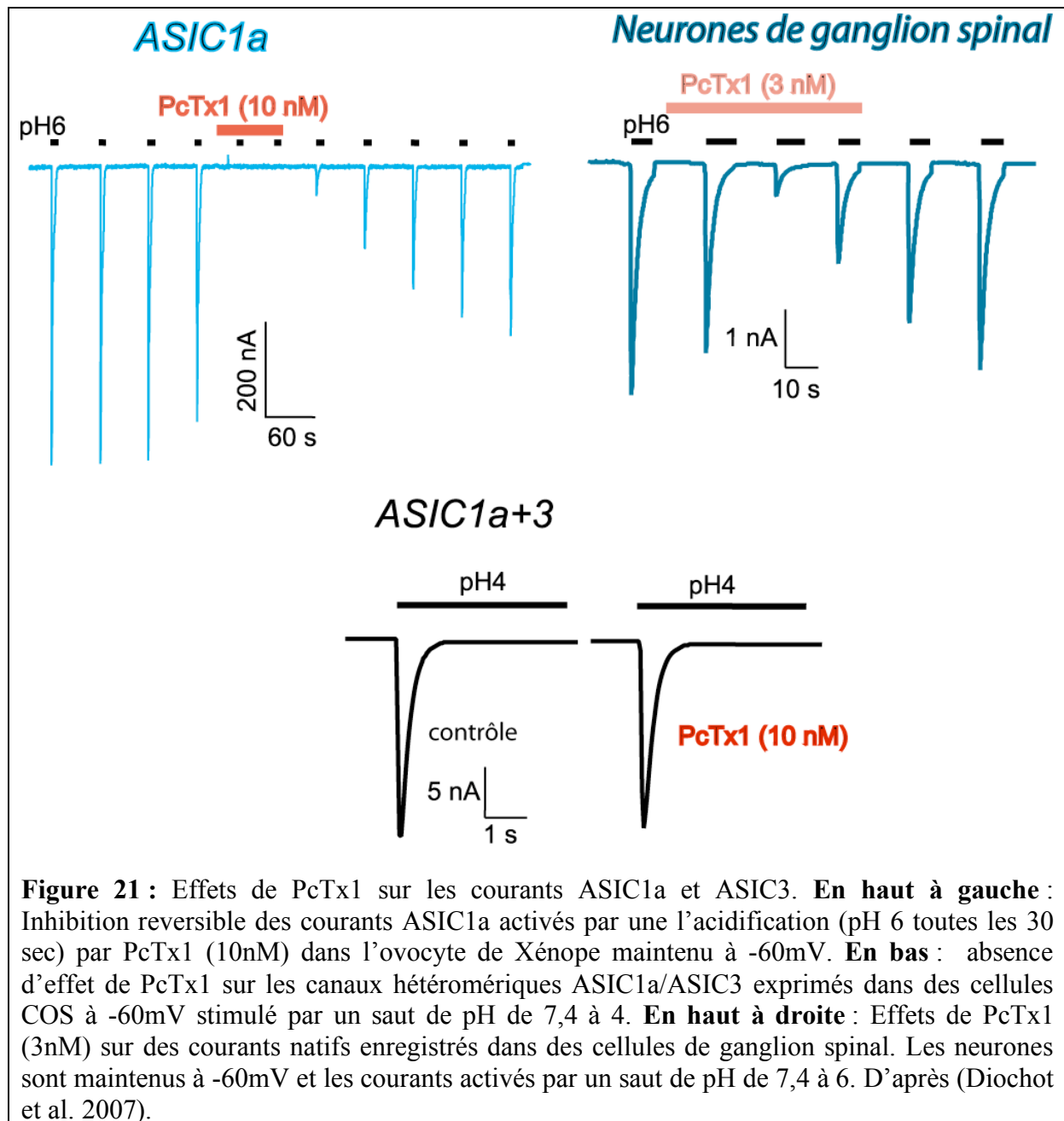
Panula et al. 1999; Vilim et al. 1999). Ces peptides potentialisent les courants générés par les canaux ASIC3 homomériques et les hétéromères ASIC3/ASIC2a (Askwith et al. 2000; Catarsi et al. 2001; Deval et al. 2003) et de manière moins importante par les canaux ASIC1a (Xie et al. 2002; Xie et al. 2003). Ces peptides augmentent l'amplitude du potentiel d'action et ralentissent l'inactivation des courants activés par le proton. L'amiloride, un diurétique bloque les courants activés générés par les canaux ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a et ASIC3 avec une faible affinité ($IC_{50} > 10 \mu M$) (Waldmann et al. 1996; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b; Chen et al. 1998; Xie et al. 2002; Xie et al. 2003). Les AINS inhibent les canaux ASIC (Voilley et al. 2001). Cependant, ni l'amiloride, ni les AINS n'ont de sélectivité particulière pour les différentes sous-unités ASIC (Voilley et al. 2001). Deux peptides, la toxine de mygale, *Psalmopeus cambridgei*, PcTx1 (Psalmotoxine 1) (Fig.22) et la toxine d'anémone de mer APETx2 ont été récemment isolées et présentent des propriétés inhibitrices sélectives pour les canaux ASIC1a et ASIC3 (Escoubas et al. 2000; Diochot et al. 2004). A noter également que le composé A317567 issu du laboratoire Abbott est un bloqueur prometteur des canaux ASIC.

3.9.1 PcTx1, un inhibiteur sélectif de haute affinité d'ASIC1a

PcTx1 est un peptide qui a été purifié du venin de la mygale *Psalmopeus cambridgei* (Escoubas et al. 2000). C'est un peptide de 40 acides aminés possédant 3 ponts dissulfure. Son poids moléculaire est de 4689,40 Da et possède un point isoélectrique ($pI = 10.38$). Cette toxine est présente en faibles quantités dans le venin de *Psalmopeus cambridgei*. Une toxine recombinante ainsi qu'une toxine synthétique ont été produites. Ceci a permis, l'étude de sa structure et de ses propriétés pharmacologiques (Escoubas et al. 2000; Escoubas et al. 2003). Les toxines natives, recombinantes et synthétiques inhibent de manière identique les canaux ASIC1a homomériques dans de nombreux systèmes d'expression cellulaire hétérologues. Cette inhibition est d'une grande affinité ($IC_{50} < 1 nM$). Le blocage d'ASIC1a par PcTx1 se fait à pH 7,4 alors que le canal est fermé, il est réversible et complet à 10 nM (Escoubas et al. 2000). Le mode d'action de PcTx1 est celui des toxines modifiant l'ouverture d'un canal sans en obstruer le pore.

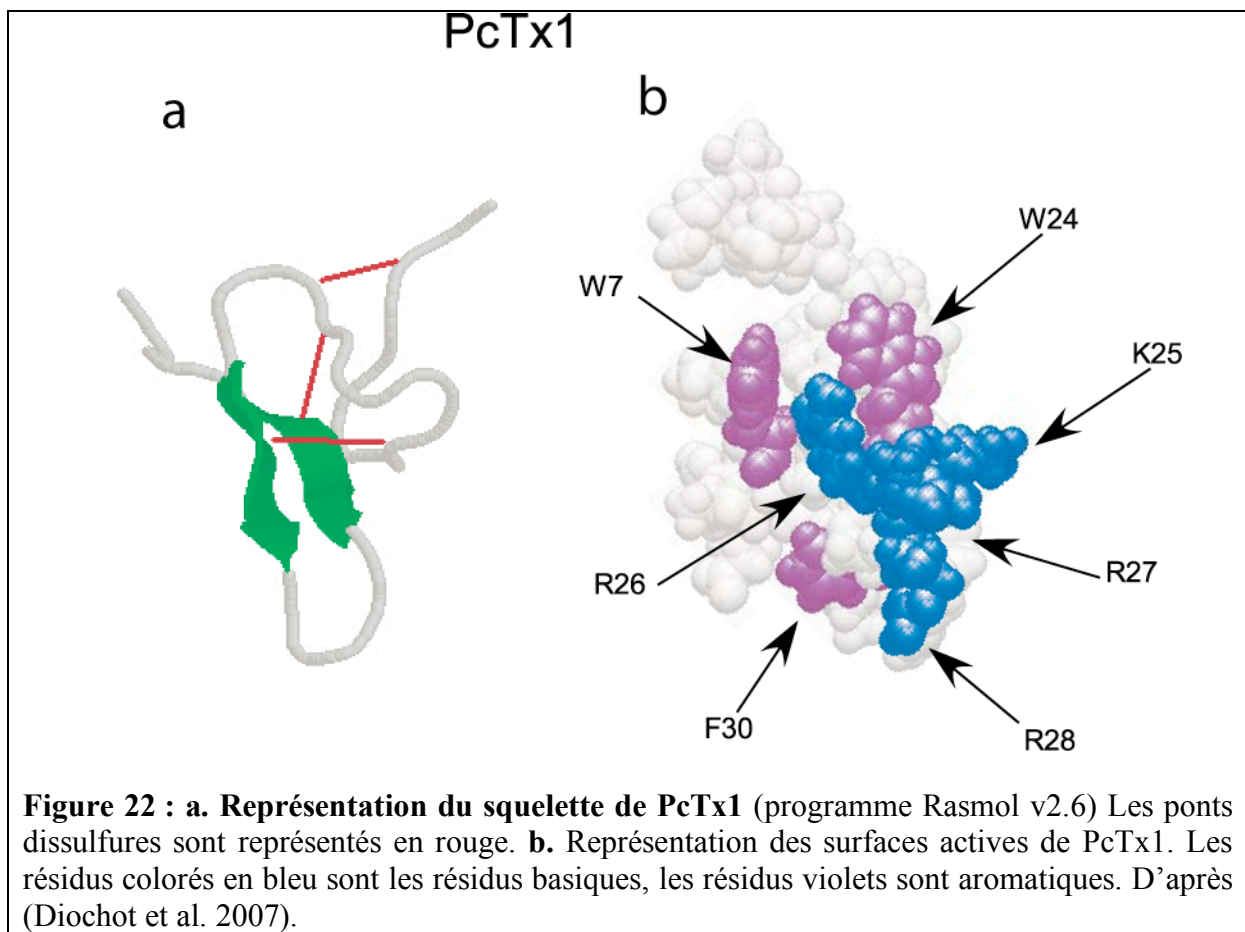
L'avantage de ce type d'inhibiteurs est que ce blocage est indépendant de la

conformation ouverte ou fermée du canal, ce qui est particulièrement important dans le cas des canaux voltage-dépendants qui subissent d'importantes variations conformationnelles lors de leur activation. Les molécules comme PcTx1 sont connues pour modifier la réponse au voltage des canaux voltage-dépendants et affecter par conséquent leurs propriétés d'ouverture et de fermeture (Nicholson et al. 1996; Winterfield and Swartz 2000). PcTx1 en augmentant l'affinité d'ASIC1a pour les protons, induit un décalage de sa courbe de désensibilisation (0,27 unité pH) et de sa courbe d'activation suffisante pour désensibiliser ces canaux à pH 7,4 et empêcher leur activation (Chen et al. 2005). L'inhibition d'ASIC1a par PcTx1 est également dépendante de la concentration extracellulaire en calcium qui entre en compétition avec la liaison de la toxine sur le canal. PcTx1 est un bloqueur sélectif d'ASIC1a homomérique et n'a pas d'activité sur les autres conformations des canaux ASIC (Escoubas et al. 2000). De plus, ce peptide n'a pas d'effet sur les canaux ioniques K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} voltage-dépendants (Escoubas et al. 2000). L'interaction d'ASIC1a avec PcTx1 est dépendante de l'état d'activation du canal (Chen et al. 2006a). En effet, le peptide se lie plus facilement aux conformations ouverte et inactivée d'ASIC1a (Fig.21).



Structure de PcTx1

La production de PcTx1 recombinante a permis de déterminer sa conformation tridimensionnelle en solution (Escoubas et al. 2003). La structure de PcTx1 consiste en un cœur compacté par des ponts dissulfures duquel sortent trois boucles et les extrémités N- et C-terminales. Sa structure secondaire comprend 3 feuillets- β antiparallèles comprenant les résidus 7-9, 21-24 et 31-34. En raison d'une forte anisotropie électrostatique, PcTx1 peut être représentée comme un cône tronqué ayant un moment dipolaire parallèle à l'axe principal de la molécule. PcTx1 appartient à la famille des ICK (pour Inhibitor Cystine Knot) qui comprend d'autres toxines d'araignées et de coquillages agissant sur les canaux calciques, sodiques et potassiques (Norton 1991; Adams et al. 1993; Swartz and MacKinnon 1995; Norton and Pallaghy 1998; Craik et al. 2001). Les cystines en formant des ponts dissulfures confèrent une forme compacte très résistante à ces molécules et leur permet d'avoir diverses fonctions biologiques (Fig.22).



3.9.2 Surface d'interaction de PcTx1 avec ASIC1a

Le peptide PcTx1 interagirait avec ASIC1a par l'intermédiaire de ses résidus hydrophobes entourés par de résidus basiques et acides qui attachent la toxine en formant des ponts hydrogènes (Escoubas et al. 2003; Salinas et al. 2006).

3.9.3 Implication de PcTx1 dans l'étude des fonctions d'ASIC1a

Le peptide PcTx1 a permis de disséquer la contribution du canal ASIC1a homomériques dans plusieurs préparations de neurones en culture, dans les petits neurones de ganglion spinal, dans les neurones granulaires du cervelet et les neurones de l'hippocampe (Escoubas et al. 2000; Baron et al. 2002a; Mamet et al. 2002).

De même, PcTx1 a déjà permis de caractériser le rôle d'ASIC1a dans le système visuel (Ettaiche et al. 2006). La neutralisation de la fonction d'ASIC1a par PcTx1 diminue significativement et de façon réversible les ondes photopiques et les potentiels oscillatoires. De même, le venin de la mygale *Psalmopeus Cambodgei* a été utilisé comme inhibiteur d'ASIC1a pour démontrer le rôle neuroprotecteur du blocage de ce canal au cours l'ischémie cérébrale (Xiong et al. 2004; Pignataro et al. 2007), de l'inflammation axonale (Friesse et al. 2007), de l'hypersensibilité induite par l'inflammation (Duan et al. 2007), du conditionnement par la peur (Coryell et al. 2007) et un effet inhibiteur de la dégénérescence axonale dans un modèle murin d'encéphalomyélite aiguë disséminée.

3.10 Régulation de l'activité des canaux ASIC

Ainsi, l'activité des canaux ASIC peut être augmentée, à la fois en situations physiologique (transmission synaptique) et pathologiques (inflammation, ischémie), rendant la réponse des neurones à l'acidité extracellulaire plus importante. Nous traitons ici les mécanismes de régulation à court terme, en dehors de la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle, notamment la liaison à un médiateur soluble dont la seule présence ne suffit pas à générer de courant.

3.10.1 Médiateurs solubles

Le courant endogène de type ASIC3 peut être modulé par différents effecteurs en fonction de la pathologie (la sérotonine via l'activation de la voie de la PKC, et le NO). Ainsi, l'amplitude du courant ASIC3 est fortement augmentée par les neuropeptides de mammifères NPSF (Ser-Leu-Ala-Ala-Pro-Gln-Arg-Phe-amide) et NPFF (Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-amide) apparentés au peptide FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-amide) d'*Helix aspersa* (Askwith et al. 2000; Deval et al. 2003; Lingueglia 2007) (voir 5.5.3). Ces neuropeptides peuvent être synthétisés et relargués au cours de l'inflammation à partir de la corne dorsale de la moelle épinière après stimulation par la substance P (Zhu et al. 1992). Au cours d'une ischémie cardiaque, l'intensité du courant ASIC3 endogène des nocicepteurs thoraciques afférents est sensibilisée par le relargage de lactate, qui agit par titration du calcium extracellulaire (Immke and McCleskey 2001). Le lactate est incapable d'activer seul les canaux ASIC. Il s'agit d'hétérosensibilisation, mécanisme par lequel un stimulus (lactate) sensibilise (*via* les canaux ASIC) les nocicepteurs sans les activer directement. Au niveau du système nerveux central, ASIC1a et ASIC2a sont exprimés par les neurones de l'hippocampe où ils modulent l'activité synaptique : ASIC1a est présent sous forme de canaux homomériques et hétéromériques ASIC1a/ASIC2a. La présence de l'isoforme ASIC2a confère alors à l'hétérodimère une sensibilité au zinc présent dans les vésicules synaptiques, qui augmente à la fois sa sensibilité au pH et l'amplitude de son courant (Baron et al. 2001).

3.10.2 Considérations

Les canaux ASIC supportent la plupart des courants neuronaux rapides induits par l'acidité. L'hypothèse la plus évidente quant à leur fonction au sein du système sensoriel est donc la perception de l'acidose tissulaire douloureuse. Or, pour cette fonction, les phénotypes des souris invalidées pour les canaux ASIC2a ne sont pas marquants et ils sont ambigus pour ASIC3. Il faut alors considérer que les canaux ASIC ont une sensibilité intrinsèque au pH et que de ce fait, *in vivo*, la réponse aux protons d'un neurone donné est le résultat de l'intégration des courants de l'ensemble des canaux ASIC en présence. Deux situations de compensation sont alors envisageables : (i) si un neurone n'exprime qu'un seul type de canal ASIC, il est possible que la perte de sensibilité aux protons de ce neurone puisse être récupérée par d'autres neurones qui expriment d'autres isoformes ASIC, (ii) si un neurone exprime plusieurs isoformes ASIC, le courant induit à un pH donné est formé par l'ensemble des canaux ASIC qui agissent sous forme homo- et/ou hétéromérique. Dans ce cas, la perte d'une seule isoforme peut entraîner une modification de ce courant, mais non sa perte totale. Ainsi, *in vivo*, il est tout à fait cohérent de penser que la présence de plusieurs isoformes ASIC compense la perte de l'une d'entre elle. Ce qui expliquerait l'absence de phénotype à la douleur des souris invalidées pour le gène codant ASIC1a. Il faut ajouter à cela le fait que les souris ne sont certainement pas le meilleur modèle animal pour déterminer si des variations de pH cutané sont susceptibles d'induire des modifications sensorielles. De plus, des phénomènes de compensations développementales sur les niveaux d'expression d'autres gènes peuvent exister et interférer avec le phénotype des animaux. Notons que l'absence de phénotype clair n'est pas un phénomène isolé : l'effet analgésique de la morphine est intact chez les souris invalidées pour le gène codant le récepteur δ aux opioïdes, dont l'implication dans la réponse aux opioïdes est pourtant bien décrite (Mogil and Grisel 1998). La situation est tout à fait différente dans le cas de la mécanotransduction car les canaux ASIC ne possèdent pas de sensibilité mécanique intrinsèque : ils agissent donc probablement au sein d'un complexe mutimérique mécanotransducteur. Dans cette situation, la perte d'une isoforme ASIC correspond à la perte d'un élément du complexe qui n'est pas forcément récupérable par d'autres isoformes car elle implique une spécificité de liaisons protéine-protéine. De ce fait, la

fonction des canaux ASIC dans la mécanosensation est mieux détectable par les approches transgéniques. Les résultats des études d'invalidation sont donc importants et révèlent qu'au moins ASIC2a et ASIC3 sont impliqués dans le toucher et la nociception.

Nos travaux nous ont conduit à considérer les canaux ASIC non pas en tant que senseur du message nociceptif mais plutôt en tant qu'acteurs potentiels de la modulation de l'information nociceptive. Le lien entre le système nerveux périphérique, propageant le signal nociceptif et le système nerveux central, modulant ce même signal est devenu évident à la lumière de nos résultats. En effet, notre outil principal, le peptide PcTx1, nous a permis de mettre en évidence l'implication du canal ASIC1a dans le contrôle du système opioïdérique. Aussi, nous allons maintenant décrire le système opioïdérique, principal responsable de la modulation de la douleur chez les mammifères.

4 Mécanismes endogènes de contrôle de la douleur et analgésie

4.1 Les mécanismes endogènes de contrôle de la douleur

L'un des domaines dans lesquels il y a eu le plus de progrès dans notre compréhension de la douleur et de son traitement est celui du rôle des mécanismes endogènes de contrôle de la douleur. Depuis la théorie du « gate control » (Melzack and Wall 1965), qui propose que l'information douloureuse ne circule pas de façon linéaire mais qu'elle est modulée dès son arrivée dans la moelle épinière, plusieurs études indiquent que l'information nociceptive est modulée à tous les niveaux du système nerveux central. Cette modulation peut être excitatrice et augmenter la réponse nociceptive ou inhibitrice et produire une analgésie (Millan 2002). Ainsi, il est possible que le dérèglement de ces mécanismes endogènes de contrôle de la douleur soit la source de certaines douleurs chroniques. Les douleurs persistantes n'ont pas donc pas pour unique origine une augmentation des afférences nociceptives, mais peuvent aussi résulter d'une baisse de l'inhibition ou d'une augmentation de l'excitation centrale. Ces mécanismes endogènes sont complexes et font appel à une large gamme de neurotransmetteurs comme la sérotonine et la noradrénaline qui sont normalement associées aux mécanismes endogènes inhibiteurs de la douleur mais peuvent aussi jouer un rôle excitateur. Le rôle excitateur ou inhibiteur de certaines cellules du bulbe rachidien rostro-ventral est déjà connu depuis quelques années (Basbaum and Fields 1978; Le Bars et al. 1979a; b; Fields and Heinricher 1985).

Des études récentes font bien ressortir la complexité de certains mécanismes de transmission de l'influx nerveux à la suite d'une condition chronique, comme c'est le cas pour la réponse GABAergique qui est normalement inhibitrice, mais qui, dans certaines conditions, peut devenir excitatrice (Coull et al. 2003). Un autre exemple permettant d'approcher la complexité des mécanismes dynamiques de la régulation du système nociceptif est le phénomène d'hyperalgésie opioïdergique. Les opioïdes sont les analgésiques les plus puissants à notre disposition. Pourtant, même de faibles doses d'opioïdes peuvent parfois produire une hyperalgésie. Plusieurs

mécanismes sont proposés pour expliquer ce phénomène paradoxal, dont la sensibilisation de certains récepteurs nociceptifs (NMDA, CCK) et le blocage de mécanismes inhibiteurs endogènes (Mao 2002; Xu et al. 2003). Sur le plan pharmacologique, la compréhension du rôle des mécanismes endogènes permet de mieux appréhender des phénomènes cliniques étranges, comme celui du patient qui voit sa douleur augmenter lorsqu'il consomme des médicaments analgésiques.

Afin de mieux comprendre le rôle de ces mécanismes endogènes nous allons les scinder en trois niveaux d'inhibition des afférences nociceptives dans le système nerveux central (Marchand 1998).

1. Les mécanismes spinaux produisant des effets localisés
2. Les contrôles inhibiteurs descendant qui produisent des effets diffus
3. Les mécanismes des centres supérieurs, qui peuvent avoir un effet diffus ou localisé.

4.2 Les mécanismes spinaux

Depuis 1965, année de publication de la célèbre théorie du « gate control » par Melzack et Wall (Melzack and Wall 1965), nous savons que les informations nociceptives sont modulées dès leur entrée dans la moelle. Selon cette théorie, la stimulation des afférences de gros calibre (fibre A β) recrute des interneurons inhibiteurs dans la substance gélatineuse des cornes dorsales de la moelle épinière. Il est intéressant de décomposer cette théorie afin de mieux envisager ses implications à la lumière des connaissances actuelles. Dans un premier temps, les afférences nociceptives A δ et C entrent en contact synaptique avec les neurones secondaires de la moelle (fibres afférentes médullaires). Il est proposé que les afférences nociceptives inhibent les interneurons inhibiteurs de la substance gélatineuse facilitant ainsi le passage de l'information nociceptive. Des études récentes mettent en évidence qu'à la fois, les afférences nociceptives et les afférences non nociceptives sont capables d'activer les interneurons inhibiteurs et par conséquent d'induire un effet inhibiteur localisé (Millan 1999).

De plus, dans certains modèles de douleur neuropathique, les neurones non nociceptifs recrutent les neurones nociceptifs secondaires et induisent un signal douloureux, ce qui explique en partie le phénomène d'allodynie ou de sensation

douloureuse à la suite d'une stimulation normalement non douloureuse. Il est intéressant de noter que certaines douleurs impliquant des réponses allodyniques et hyperalgésiques peuvent résulter d'une perte des systèmes inhibiteurs toniques au niveau spinal (Traub 1997; Millan 1999).

Dans l'expérience de stimulation électrique transcutanée à basse intensité (TENS), on a longtemps postulé que l'analgésie produite était de nature non opioïdergique en raison de la persistance de la réponse analgésique après injection de naloxone, un puissant antagoniste compétitif des récepteurs opioïdes (Sjolund and Eriksson 1979; Freeman et al. 1983). Cependant, certaines études laissaient supposer le contraire, soit un blocage de l'inhibition par la naloxone, suggérant un effet opioïdergique de la TENS (Pertovaara and Kemppainen 1981; Skolnick et al. 1989). Il fut alors proposé que les effets opioïdergiques ou non opioïdergiques étaient dépendants de la fréquence de stimulation utilisée (Lundeberg et al. 1985). Ainsi en fonction de l'intensité de la stimulation électrique, les récepteurs stimulés (et par conséquent les fibres activés) diffèrent et ainsi stimulent ou non le système opioïdergique (Sluka and Walsh 2003). Cette composante opioïdergique du TENS est suffisamment importante pour qu'une tolérance opioïdergique se développe à la suite d'une utilisation soutenue (Chandran and Sluka 2003).

D'autres récepteurs sont aussi impliqués dans l'analgésie produite par le TENS comme les récepteurs à l'adénosine (Salter and Henry 1987; Marchand et al. 1995; De Koninck 1997), ce qui souligne la complexité de la modulation des afférences nociceptives au niveau spinal car elle implique un grand nombre de neurotransmetteurs.

4.3 Les mécanismes descendants : les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs

Quelques années après la publication de la théorie du « gate control », Reynolds met en lumière que la stimulation d'une région du tronc cérébral, la substance grise périaqueducale (SGPA), provoque une analgésie suffisante pour réaliser une chirurgie chez le rat sans autre analgésique (Reynolds 1969). Le rôle du bulbe rostro-ventral dans la modulation de la douleur après stimulation nociceptive est par la suite bien démontré (Basbaum and Fields 1978; Fields and Basbaum 1979).

Des régions spécifiques, dont le SGPA et les noyaux du raphé, ont été identifiées comme étant à l'origine des voies descendantes sérotoninergiques pour le premier et noradrénergiques pour le second. Ces voies descendantes ont pour fonction de recruter les interneurones enképhalinergiques spinaux et ainsi de produire une réponse analgésique par réduction de l'activité des afférences nociceptives (Fig.23).

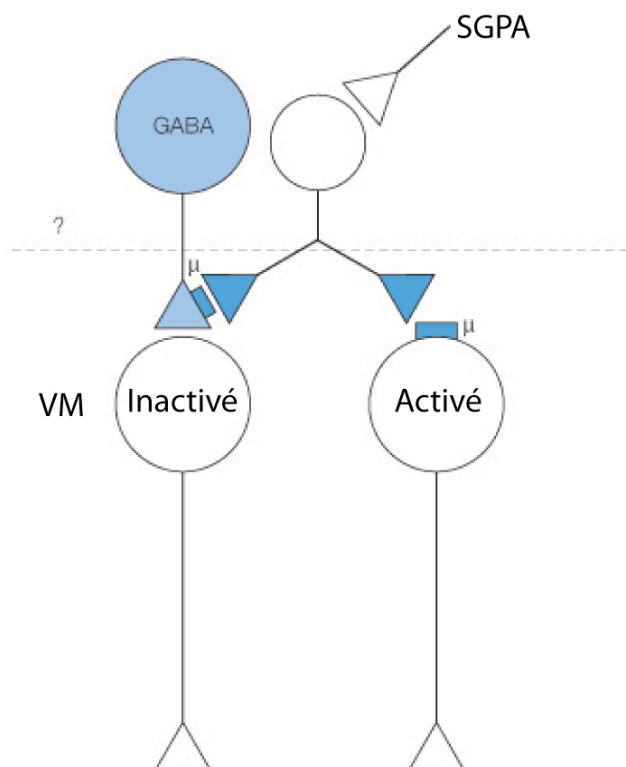


Figure 23 : Circuit modulateur spinal opioïdérique provenant du tronc cérébral. Les neurones de la substance grise périacqueducale (SGPA) activent un neurone opioïde (probablement enképhalinergique). Ce neurone opioïdérique inhibe les terminaisons GABAergiques exprimant des récepteurs m. L'inhibition des afférences GABAergiques désinhibe la cellule quiescente qui en s'activant inhibe à son tour la transmission nociceptive au niveau de la corne dorsale. L'origine des afférences GABAergiques au niveau du tractus ventromédian (VM) et la localisation exacte des neurones opioïdes n'est pas connue.

C'est à la fin des années 1970 que le concept du contrôle inhibiteur diffus nociceptif (CIDN) est proposé (Le Bars et al. 1979a; b). Ce modèle expose comment une stimulation nociceptive localisée produit une inhibition généralisée des afférences nociceptives. Dans le modèle du CIDN, Le Bars et collaborateurs proposent qu'une stimulation nociceptive, en plus de conduire les informations nociceptives vers les centres supérieurs par la voie spinothalamique, envoie des

afférences vers différents centres du tronc cérébral dont la SGPA et les noyaux du raphé qui vont à leur tour envoyer des efférences inhibitrices vers les différents niveaux spinaux et ainsi produire une inhibition diffuse. Néanmoins, des études impliquant des lésions pratiquées à différents niveaux du tronc cérébral chez le rongeur permettent de conclure que le CIDN fait appel à des structures du bulbe rachidien caudal, donc sans rapport avec la SGPA du mésencéphale (Gall et al. 1998). Selon la théorie du CIDN, la stimulation nociceptive active le pool de neurones nociceptifs correspondant au segment médullaire qu'ils innervent tout en inhibant les autres neurones nociceptifs de la moelle desservant le reste du corps.

Chez l'animal, une lésion du funiculus dorsolateral qui est la principale voie efférente du système inhibiteur descendant, produit une hyperalgésie (Davies et al. 1983; Abbott et al. 1996), ce qui suggère qu'il existe une inhibition tonique du message nociceptif. La faible concentration de sérotonine et/ou de noradrénaline dans le liquide céphalorachidien de patients souffrant de douleurs chroniques comme la fibromyalgie, soulève la possibilité d'un déficit de ces mécanismes inhibiteurs. Des études plus récentes supportent cette idée (Kosek and Hansson 1997; Lautenbacher and Rollman 1997; Staud et al. 2003; Julien et al. 2005).

Une meilleure compréhension des mécanismes inhibiteurs descendants permettrait de cibler le rôle potentiel de certains médicaments sérotoninergiques et noradrénergiques dans la douleur, comme c'est le cas pour l'effet antalgique de certains antidépresseurs.

4.4 Contrôle des centres supérieurs

Au cours des dernières années, l'évolution des connaissances concernant le rôle des régions corticales responsables de la composante sensorielle et émotive de la douleur a été particulièrement importante. Ceci en grande partie grâce aux progrès des techniques d'imagerie cérébrale, notamment de l'imagerie fonctionnelle (IRMf et TEP).

Il est évident que les manipulations cognitives influencent la perception de la douleur. L'hypnose illustre parfaitement ce phénomène. Dans une étude, le sujet sous hypnose reçoit des suggestions proposant que la douleur produite par une stimulation thermique nociceptive soit plus ou moins désagréable tout en demeurant

d'intensité comparable. L'activité du cortex somatosensoriel primaire, associé à la composante sensori-discriminative de la douleur, est demeurée inchangée entre les deux conditions tandis que l'activité du cortex cingulaire antérieur (CCA), associée à la composante émotive de la douleur, était significativement réduite pendant la condition de suggestion de la douleur moins désagréable (Rainville et al. 1997). Ces données viennent confirmer que la simple suggestion cognitive de perception se répercute sur l'activité cérébrale.

Une autre série d'études mettent en lumière la relation étroite entre la composante cognitive et la pharmacologie de la douleur concerne la réponse au placebo. Il est maintenant bien établi que le placebo produit ses effets analgésiques par des mécanismes endorphinergiques pouvant être inhibés par la naloxone (Levine et al. 1978). Ces données laissent présumer que l'effet placebo s'explique par la libération de substances opioïdes endogènes produisant un effet diffus. Néanmoins, des travaux récents mettent en évidence que l'effet analgésique du placebo est dépendant du conditionnement. Ainsi, si le placebo est présenté à la suite de médicaments opioïdes, la naloxone réversera ses effets. Cependant, si le traitement qui précède n'est pas un opiacé, la naloxone sera sans effet (Amanzio and Benedetti 1999). Ainsi le conditionnement permet de déclencher des effets opioïdiques pouvant être localisés (Benedetti et al. 1999).

La même équipe de recherche propose dans une étude clinique élégante que la variabilité inter-sujet, à la suite de l'utilisation post-opératoire de différents analgésiques, s'explique en partie par l'effet placebo (Amanzio et al. 2001). Dans cette étude, les chercheurs ont mesuré l'effet analgésique de différents analgésiques en période post-opératoire dans une condition où le sujet reçoit le médicament à son insu (par pompe à perfusion intraveineuse) tandis que dans l'autre cas, un professionnel de santé venait directement donner au patient son médicament pour calmer ses douleurs. Lorsque les patients avaient des attentes de soulagement, l'analgésie était plus élevée que lorsqu'ils n'en avaient pas, comme cela était attendu. De plus la variabilité entre les sujets était beaucoup plus grande dans le groupe qui recevait le traitement analgésique du professionnel de santé que dans celui où il était délivré à leur insu. Ainsi, l'analgésie ressentie est le produit de l'effet direct de l'agent analgésique sur leurs récepteurs et cet effet est relativement constant entre

individus, mais il s'additionne aussi d'un effet indirect provoqué par les attentes du patient, qui est un facteur beaucoup plus variable.

Une autre observation mettant en avant les effets analgésiques du placebo a été rapportée chez des patients souffrant de douleurs chroniques implanté avec un stimulateur thalamique. Chez les patients porteurs de stimulateurs thalamiques non fonctionnels, il persiste un effet placebo important même quand le sujet est implanté depuis plus de dix ans (Marchand et al. 2003).

Ainsi, encore une fois, il semble que le rôle du système opioïdergique dans la modulation de la douleur ou de sa perception semble majeur. Nous allons donc étudier de plus près ce système.

5 Le système opioïdergique

Les opioïdes, et la morphine, sont à l'heure actuelle, les médicaments les plus efficaces que l'on peut utiliser pour soulager les douleurs modérées et les douleurs les plus sévères. Cependant, l'utilisation de ces drogues n'est pas anodine compte-tenu de leurs nombreux effets secondaires qui sont pour la plupart associés à leur action analgésique. Ainsi, une connaissance plus approfondie du système opioïdergique est indispensable afin de mieux utiliser leurs propriétés analgésiques à des fins thérapeutiques.

5.1 Historique

Les effets de l'opium sont probablement connus depuis plus de 5000 avant J.C.. A cette époque, les sumériens cultivaient le pavot (*Papaver somniferum*) pour extraire le suc sécrété par sa capsule à des fins religieuses (effet euphorisant) et médicales (effet antitussif ou antidiarrhéique). Il a fallu attendre 1817 pour que Sertürner documente le principe d'extraction du composé actif de l'opium qu'il appela morphine, de Morphée, le dieu grec du sommeil. Quelques années plus tard, la codéïne sera isolée de l'opium. Dans les années 1850, l'usage de la morphine se répandit afin de permettre les interventions chirurgicales, particulièrement durant la guerre entre la France et la Prusse mais aussi pendant la Guerre de Sécession en Amérique du Nord. C'est en 1901 que le japonais Katawa injectera pour la première fois la morphine dans l'espace sous arachnoïdien. Cette technique sera redécouverte 75 ans plus tard (Matsuki 1983) et est toujours utilisée de nos jours, notamment lors des anesthésies péridurales dans les maternités, où la morphine est co-injectée avec d'autres drogues comme la buvacaine. Durant la première moitié du XX^{ème} siècle sont apparues les synthèses de différents morphiniques agonistes, antagonistes-agonistes comme la N-allylnor-codéïne, la méthadone, la N-allylnormorphine, la morphine péthidine, puis celle des autres substances morphiniques au cours de la deuxième moitié de ce siècle. La mise en évidence des récepteurs opioïdes principaux, μ , δ et κ , date du début des années 1970, puis celle des opioïdes endogènes avec notamment la découverte de ceux qui seraient les agonistes endogènes

spécifiques des récepteurs μ , les endomorphines par Zadina et ses collaborateurs en 1997 (Zadina et al. 1997). Néanmoins, malgré l'ancienneté de la connaissance des effets analgésiques des opioïdes et la somme colossale des travaux qui leur sont consacrés, de très nombreuses interrogations persistent au sujet de leur mécanisme d'action précis avec notamment l'impossibilité de dissocier l'analgésie de la tolérance et de la dépendance.

5.2 Structure générale des opioïdes et classification

L'opium contient de nombreux alcaloïdes naturels dont la morphine, la codéïne, la thébaïne, la noscapine et la papavérine. Ce dernier composé est un relaxant des fibres musculaires lisses alors que les autres possèdent des propriétés analgésiques plus ou moins puissantes.

La structure de la morphine a été déterminée en 1902. La morphine est un dérivé phénanthrène possédant deux anneaux plan et deux anneaux aliphatiques lui donnant une structure en T. Certaines substitutions sur des groupements hydroxylés ou azotés permettent de constituer de nouvelles molécules analogues de la morphine (Gutstein and Akil 2001).

Les opioïdes peuvent être classés en fonction de leur structure chimique (composés synthétiques, semi-synthétiques ou endogènes) ou de leur action pharmacologique sur les différents récepteurs, agonistes purs (morphine, fentanyl), agonistes faibles (codéïne, méthadone, dextropropoxyphène), agonistes partiels et agonistes-antagonistes mixtes (buprénorphine, nalorphine, pentazocine, nalbuphine) et antagonistes (naloxone, naltrexone, ...).

5.2.1 Récepteurs opioïdes et classification

La mise en évidence de l'action des opioïdes sur des récepteurs spécifiques a été possible par des études de liaison réalisées par Snyder (Snyder et al. 1973) et collaborateurs. Cependant, l'existence d'antagonistes spécifiques suggérait déjà que de tels récepteurs existaient (Rang et al. 2003). Compte tenu de l'éventail important des effets des opiacés (analgésie, sédation, myosis...), l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs était attendue. Finalement, quatre types de récepteurs opioïdes ont été mis en évidence entre le début des années 1992 et l'année 1994. Les premiers

mis en évidence sont les récepteurs δ (OP₁ ou DOR ou DOP) (Evans et al. 1992; Kieffer et al. 1992), puis ce fut le tour des récepteurs κ (OP₂ ou KOR ou KOP) (Chen et al. 1993) et μ (OP₃ ou MOR ou MOP) (Yasuda et al. 1993), enfin le récepteur ORL1 (Opioïd Receptor Like 1) (OP₄ ou NOR ou NOP) a été découvert (Mollereau et al. 1994) (voir 5.4.4.1) . Ces récepteurs présentent des caractéristiques de liaison et des propriétés fonctionnelles compatibles avec leur identité.

5.2.1.1 Les sous-types de récepteurs des opioïdés

De nombreuses observations suggèrent l'existence de sous-types de récepteurs des opioïdés. Ces sous-types pourraient correspondre à différents états d'un même récepteur, dépendant de son couplage avec les protéines G de transduction.

5.2.1.1.1 Les récepteurs μ

D'après Pasternak, il y aurait deux sous-types de récepteurs, appelés μ 1 et μ 2 (Pasternak and Wood 1986). Si la biologie moléculaire permet d'établir formellement leur réalité, ils prendront le nom, selon la nomenclature de l'IUPHAR, de récepteur OP3A et OP3B, respectivement. Le profil pharmacologique du récepteur μ cloné semble correspondre à celui du récepteur μ 1. Ce récepteur se distingue, en particulier, par une affinité plus élevée pour le DAGO que le sous-type μ 2. Le sous-type μ 2 pourrait correspondre au récepteur μ " conventionnel ", présentant le profil pharmacologique des récepteurs μ mis en évidence dans l'iléon de cobaye. Le meptazinol et l'étonitazène seraient des agonistes, et la naloxazone et la naloxonazine des antagonistes préférentiels du sous-type μ 1. Le composé TRI M-5, un analogue des enképhalines, pourrait être un agoniste relativement spécifique du sous-type μ 2 tout en se comportant comme un antagoniste vis-à-vis du sous-type μ 1. Certaines données suggèrent que l'héroïne, le fentanyl et l'un des métabolites de la morphine, le 6 b-glucuronide (M6G) agiraient *via* un sous-type de récepteur μ distinct de ceux par l'intermédiaire desquels la morphine exerce ses effets. La 3- méthoxynaltrexone a été proposée comme un antagoniste sélectif du site de liaison responsable des actions analgésiques de l'héroïne et du M6G (Pasternak and Wood 1986).

5.2.1.1.2 Les récepteurs δ

Une seule protéine présentant le profil pharmacologique d'un récepteur a été clonée. Toutefois, de nombreuses données suggèrent l'existence de récepteurs $\delta 1$ et $\delta 2$. Un certain nombre d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs δ sont d'ailleurs aujourd'hui considérés comme des ligands spécifiques, ou sélectifs, de l'un ou l'autre sous-type. Le profil pharmacologique du récepteur cloné est proche de celui du sous-type $\delta 2$ (Rang et al. 2003).

5.2.1.1.3 Les récepteurs κ

L'existence de sous-types des récepteurs κ est moins bien établie. Ainsi, les agonistes de type acylacétamide, comme les composés U 50 488 H, U 69 593 ou CI-977, semblent ne se lier qu'à une partie des sites κ (sous-type $\kappa 1$, dont le profil pharmacologique est proche de celui du récepteur cloné), tandis que les molécules appartenant à la famille des benzomorphans interagiraient avec les sous-types $\kappa 2$ et $\kappa 3$. L'antagoniste κ le plus connu, la nor-binaltorphimine (nor-BNI), pourrait bloquer les sous-types $\kappa 1$ et $\kappa 2$ (Rang et al. 2003).

5.2.1.2 Distribution des récepteurs des opioïdes

Jusqu'à présent, on a toujours noté une bonne corrélation entre les distributions des récepteurs μ , δ et κ , telles qu'elles avaient été d'abord établies à l'aide de la technique d'autoradiographie quantitative, et telles qu'elles apparaissent à la lumière des études de détection (par hybridation *in situ*) des ARN messagers codant pour les récepteurs et des récepteurs eux-mêmes (par technique immunocytochimique avec des anticorps reconnaissant les protéines récepteurs). Ces nouvelles approches ayant été rendues possibles par le clonage des récepteurs des opioïdes.

5.2.1.2.1 Récepteurs μ (OP3)

Les récepteurs μ sont très largement distribués. La plus forte densité de récepteurs μ se rencontre chez le rat dans le striatum, le noyau caudé et du putamen, puis par ordre décroissant de densité dans le néocortex, le thalamus, le noyau accumbens, l'hippocampe et l'amygdale. La corne dorsale de la moelle épinière est relativement riche en récepteurs μ . Des concentrations modérées sont notées dans la substance grise périaqueducale et les noyaux du raphé; elles sont faibles dans l'hypothalamus, l'aire préoptique et le glomus pallidus (Ji et al. 1995; Pasternak 2004).

5.2.1.2.2 Récepteurs δ (OP1)

La distribution des récepteurs δ dans le SNC du rat est plus restreinte que celle des autres récepteurs opioïdergiques. Les densités les plus élevées se rencontrent dans le bulbe olfactif, le néocortex, le striatum (matrice) et le noyau accumbens. Ils sont rares, voire pratiquement absents, dans de nombreuses régions tels l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducale (Ji et al. 1995; Pasternak 2004).

5.2.1.2.3 Récepteurs κ (OP2)

La distribution de la sous-population des récepteurs κ sensibles aux dérivés de la série arylacétamide (sous-type $\kappa 1$) n'est pas superposable à celle de ceux où se fixent les benzomorphans. En outre, les différences entre les espèces animales sont particulièrement marquées. Par exemple, chez le Cobaye, la plus forte densité de sites liant spécifiquement les arylacétamides se rencontre dans les couches profondes du cortex cérébral, la substance noire et le noyau interpedonculaire. En revanche, chez le Rat, ces sites sont presque absents du cortex cérébral, et fortement concentrés dans le noyau accumbens, le claustrum, et le noyau interpedonculaire. Les sites $\kappa 1$ sont présents également dans la moelle épinière (Ji et al. 1995; Pasternak 2004).

5.2.1.3 Fonctions des récepteurs des opioïdes

5.2.1.3.1 Récepteurs μ (OP3)

Il est bien établi que les agonistes des récepteurs μ bloquent les réponses aux stimuli nociceptifs, qu'ils soient mécaniques, thermiques ou chimiques. Leur action implique des récepteurs μ situés non seulement dans les structures centrales (spinales et supraspinales) mais aussi à la périphérie (terminaisons périphériques des FAP). Le rôle clef des récepteurs μ spinaux et supraspinaux dans les effets analgésiques de la morphine (agoniste préférentiel de ces récepteurs) a été confirmé chez les souris knock-out n'exprimant pas le gène du récepteur μ (Kieffer 2000). Chez ces animaux, les effets antinociceptifs de la morphine disparaissent. De manière apparemment plus surprenante, les effets analgésiques d'agonistes δ (DPDPE, BUBU) sont également abolis chez les souris déficientes en récepteurs μ ; les effets antinociceptifs de la stimulation des récepteurs κ pourraient eux-mêmes être affectés chez de tels animaux. Toutes ces observations apportent des arguments en faveur de l'existence d'interactions entre les différents types de récepteurs des opioïdes. Les récepteurs μ sont impliqués dans de nombreuses autres fonctions physiologiques:

- la respiration : la dépression respiratoire induite par les agonistes μ serait due à une baisse de sensibilité des centres respiratoires à l'hypercapnie. Elle résulte d'une diminution du volume plutôt que de la fréquence respiratoire et implique des récepteurs μ situés aussi bien en périphérie que dans des régions centrales.

- régulation thermique : selon l'espèce animale et la température ambiante, les agonistes μ déclenchent une hypothermie ou une hyperthermie.

- les fonctions cardio-vasculaires, le transit intestinal, la prise de nourriture, l'apprentissage et la mémoire, l'activité locomotrice, la thermorégulation, les sécrétions hormonales, les fonctions immunitaires...

Tous ces phénomènes, à l'exception des sécrétions hormonales, sont inhibés par la stimulation des récepteurs μ (Kieffer and Gaveriaux-Ruff 2002; Pasternak 2004).

5.2.1.3.2 Récepteurs δ (OP1)

Les récepteurs δ sont impliqués dans l'analgésie, l'intégration motrice, la motilité intestinale, l'olfaction, la respiration, les fonctions cognitives... Chez le Rat, les agonistes δ , augmentent l'activité locomotrice et exercent des effets de type antidépresseur, qui mettent en jeu les systèmes dopaminergiques (Benbouzid et al. 2007). Les récepteurs δ de la moelle épinière sont impliqués dans les effets antinociceptifs des opioïdes. Les agonistes δ administrés par voie intrathécale apparaissent particulièrement efficaces vis-à-vis des stimulations nociceptives thermiques et chimiques. La stimulation des récepteurs δ provoque aussi une dépression respiratoire, liée à une réduction de la fréquence avec prolongation du temps expiratoire (Morin-Surun et al. 2001). Des récepteurs a périphériques et centraux (spinaux et supraspinaux) semblent être impliqués dans l'inhibition du transit intestinal provoquée par leurs agonistes sélectifs (Pasternak 2004).

5.2.1.3.3 Récepteurs κ (OP2)

Les récepteurs κ sont impliqués dans la nociception, la diurèse, la prise alimentaire et les sécrétions neuroendocrines. Les agonistes κ ont des effets antinociceptifs aussi bien chez les rongeurs que chez les primates. Cependant, des données contradictoires ont été publiées concernant la nature des stimulations nociceptives vis-à-vis desquelles la stimulation des récepteurs κ est efficace. S'il est assez largement admis que des sites spinaux sont à l'origine des effets analgésiques des agonistes κ , l'existence de sites supraspinaux et périphériques additionnels reste controversée. Les propriétés anti-diarrhéïques des opioïdes semblent mettre en jeu des récepteurs κ centraux et périphériques. L'effet diurétique des agonistes κ semble lié à une inhibition de la sécrétion de l'hormone antidiurétique. Les récepteurs κ seraient également impliqués dans la thermorégulation et le contrôle des fonctions cardio-respiratoires. Toutefois, chez les primates, parmi les agonistes des récepteurs des opioïdes, ceux qui agissent sélectivement par le biais de récepteurs κ n'ont qu'un effet modeste sur la fonction respiratoire. Contrairement aux agonistes μ , les agonistes κ ne paraissent pas avoir d'effets renforçants positifs, et peuvent même avoir une action dysphorique chez l'Homme (Reisine 1995) (Pasternak 2004).

5.2.1.4 Pharmacologie des récepteurs opioïdiques

Bien que non confirmé par les techniques de clonage, il existe des évidences pharmacologiques sous-tendant l'existence de subdivisions supplémentaires au sein des sous-types de récepteurs opioïdes mais leur signification réelle reste encore incertaine. Pasternak (Pasternak 2004) a décrit l'existence de quatorze sous-types de récepteurs μ après épissage alternatif chez la Souris pouvant expliquer les phénomènes de tolérance croisée incomplète observée en clinique lors de l'utilisation des opioïdes.

Comme toutes substances agissant sur des récepteurs, les opioïdes se définissent par une affinité et une activité intrinsèque. L'affinité d'une substance pour un récepteur caractérise la facilité avec laquelle cette substance se fixe sur son site récepteur spécifique. L'affinité des opioïdes pour les récepteurs μ a été mesurée *in vitro* à partir d'homogénats de cerveau (Stahl et al. 1977; Leysen et al. 1983). Elle est quantifiée par l'inverse de la constante d'inhibition de la liaison stéréospécifique du sufentanil tritié sur les récepteurs μ . Le sufentanil fait partie des opioïdes ayant la plus forte affinité. Cette affinité conditionne pour une part importante la puissance d'action, puisqu'une relation linéaire positive a été trouvée entre la constante d'inhibition K_i et la dose efficace analgésique chez l'animal. Ainsi, le rapport d'équipotence entre le fentanyl et le sufentanil n'est pas très différent du rapport d'affinité pour les récepteurs μ des deux opioïdes.

L'affinité des opioïdes pour les récepteurs μ conditionne aussi leurs demi-vies de dissociation, le sufentanil qui a une affinité 16 fois plus élevée que le fentanyl a également une demi-vie de dissociation plus longue (25 minutes *vs* 1,2 minute).

5.2.1.5 Les récepteurs des opioïdes dans la corne dorsale de la moelle épinière

Les trois principaux types de récepteurs des opioïdes sont représentés dans la corne dorsale.

- Les récepteurs μ et κ sont surtout présents dans les couches superficielles, en particulier la substance gélatineuse, où se terminent principalement les afférences nociceptives des neurones des ganglions spinaux (Pasternak 2004);

- En revanche, les récepteurs δ se trouvent non seulement dans les couches superficielles de la corne dorsale mais aussi les couches profondes et la corne ventrale.

- D'une manière générale, ce sont les récepteurs μ qui sont les plus abondants, au moins chez les rongeurs. Les récepteurs μ apparaissent principalement dans des localisations extrasynaptiques, ce qui suggère que les opioïdes endogènes agissant par l'intermédiaire de ces récepteurs se comportent comme des neuromodulateurs diffusant à partir de leur lieu d'origine vers les neurones environnant. Les récepteurs δ sont présents sur des fibres et des terminaisons axonales distribuées dans toute la substance grise spinale, avec les densités les plus élevées dans les couches superficielles de la corne dorsale. Certaines varicosités renferment simultanément des récepteurs δ et des récepteurs μ . La localisation des récepteurs δ spinaux semble indiquer qu'ils interviennent aussi bien dans le contrôle de l'activité des neurones enképhalinergiques (autorécepteurs) que dans la modulation présynaptique de la libération d'autres neuromédiateurs. Les récepteurs κ sont particulièrement denses dans la substance gélatineuse, où ils sont localisés principalement sur des fibres nerveuses. Un certain nombre de terminaisons axonales porteuses de récepteurs μ dérivent de neurones situés dans la substance gélatineuse de Rolando puisqu'une rhizotomie dorsale diminue la densité de l'immunoréactivité correspondante dans la lamina I et la partie externe de la lamina II. L'ensemble des données (autoradiographie, immunocytochimie et hybridation *in situ*) convergent pour indiquer que les récepteurs des opioïdes sont localisés sur des éléments neuronaux intrinsèques de la corne dorsale et sur les terminaisons de FAP. Par conséquent, les effets analgésiques de l'administration intrathécale d'opioïdes peuvent être dus à une

modulation présynaptique de l'activité des FAP aussi bien qu'à des influences postsynaptiques sur des neurones spinaux. Les données électrophysiologiques vont dans le même sens puisqu'elles sont en faveur d'une action présynaptique (en particulier pour les agonistes δ) et/ou postsynaptique (notamment pour les agonistes μ) des opioïdes dans la moelle épinière.

5.2.1.6 Mécanismes d'activation croisée des récepteurs opioïdergiques

Peart et Gross ont démontré des mécanismes de réaction croisée entre les récepteurs à l'adénosine et les récepteurs opioïdergiques (Peart and Gross 2003) au niveau cardiaque. De plus, d'autres réactions croisées entre opioïdes et adénosine ont été décrits. La liaison de DPCPX, un antagoniste des récepteurs à l'adénosine A1 (A1AR) avec son récepteur est diminuée chez les souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur μ (Bailey et al. 2002). De même, les récepteurs δ sont aussi régulés négativement chez ces souris invalidées (Kitchen et al. 1997). La concentration corticale en A1AR est augmentée après 72h de traitement par morphine chez la souris (Kaplan et al. 1994) et la morphine produit un relargage dose dépendant d'adénosine (Sandner-Kiesling et al. 2001). Plus encore, il existe un phénomène de manque croisé entre des rats prétraités à l'adénosine recevant de la naloxone et inversement chez les rats prétraités avec de la morphine à qui a été administré un antagoniste des récepteurs à l'adénosine (Coupar and Tran 2001). Il existe d'autres études mettant en évidence un lien fort entre les opiacés et le système β -adrénergique. Les catécholamines et les opioïdes endogènes sont relargués simultanément par les terminaisons nerveuses après stimulation sympathique. Il semble que les opioïdes agissent essentiellement comme des antagonistes du système β -adrénergique en limitant l'augmentation d'AMPC. Curieusement, les interactions entre les opioïdes et le système β -adrénergique semblent fonctionnelles, cette interaction pourrait être due à des effets de convergence opposée sur les voies descendantes ou alors à une dimérisation des récepteurs.

Plusieurs études démontrent que les récepteurs couplés aux protéines G sont des hétérodimères et que cette dimérisation offre des possibilités pour d'autres interactions ligand-récepteur (Jordan and Devi 1999; George et al. 2000; Gomes et al. 2000). Il semble que le complexe μ - δ soit sensible aux agonistes des récepteurs $\delta 2$ (Xu

et al. 1993; Gomes et al. 2000). Il a été montré que les récepteurs μ , δ , et κ forment des hétérooligomères (Jordan and Devi 1999; Gomes et al. 2000). De plus, les récepteurs opioïdiques se dimérisent avec d'autres sous-unités de récepteurs couplés aux protéines G, comme les récepteurs β_2 -adrénergiques et les récepteurs à la somatostatine (Jordan et al. 2001; Pfeiffer et al. 2002). Les récepteurs μ se dimérisent également avec les récepteurs adrénergiques α_2 (Jordan et al. 2003; Zhang and Limbird 2004). Les récepteurs à l'adénosine A1AR peuvent aussi former des hétérodimères avec les récepteurs P2Y1 et les récepteurs à la dopamine D1 (Gines et al. 2000), alors que les récepteurs à l'adénosine A2AR existent sous forme d'oligomères avec les récepteurs à la dopamine D2 (Kamiya et al. 2003). Les antagonistes des récepteurs à l'adénosine A1AR et A2AR inhibent l'action synergique entre les opioïdes et les récepteurs dopaminergiques D2 (Yao et al. 2003).

5.3 Les opioïdes endogènes

La transmission et l'amplification du stimulus douloureux sont modulées par des peptides endogènes, les opioïdes endogènes. Les premiers de ces peptides ont été découverts deux ans après la découverte des récepteurs opioïdiques.

Les premiers peptides morphinomimétiques endogènes caractérisés sont :

- la méthionine enképhaline (Met-enképhaline, Tyr-Gly-Gly-Phe-**Met**)
- la leucine enképhaline (Leu-enképhaline, Tyr-Gly-Gly-Phe-**Leu**).

On compte maintenant une vingtaine de peptides, identifiés entre le milieu des années 70 et le début des années 80, qui possèdent à leur extrémité N-terminale la séquence de la Met-Enképhaline ou de la Leu-Enképhaline et qui se lient aux récepteurs des opioïdes. Les morphiniques endogènes appartiennent à trois grandes familles qui dérivent chacune d'un précurseur distinct dont la structure est bien définie (cf tableau):

- la proenképhaline (ou proenképhaline A) à l'origine des enképhalines et de peptides voisins,
- la pro-opiomélanocortine (ou POMC) d'où sont issues la β -endorphine et des peptides apparentés, ainsi que d'autres peptides biologiquement actifs n'appartenant pas au groupe des endomorphines,

- la prodynorphine (ou proenképhaline B) d'où proviennent les néo-endorphines et les dynorphines.

Tableau 2 : Précurseurs et séquences des peptides opioïdes endogènes

PRECURSEUR	PEPTIDE ENDOGENE	SEQUENCE
proopiomélanocortine (POMC)	β -endorphine	YGGFMTSEKSQTPLVTL- FKNAIIKNAYKKGE
préproenképhaline	Met-Enképhaline	YGGFM
proenképhaline	Leu-Enképhaline	YGGFL YGGFMRF YGGFMRGL
prodynorphine	Dynorphine A	YGGFLRRIRPKLKWDNQ
	Dynorphine A(1-8)	YGGFLRRI
	Dynorphine B	YGGFLRRQFKVVT
	α -néoendorphine	YGGFLRKYPK
	β -néoendorphine	YGGFLRKYP
?	Endomorphine-1	YPWF-NH ₂
	Endomorphine-2	YPFF-NH ₂
prépronociceptine	nociceptine	FGGFTGARKSARKLANQ

Ces peptides vont exercer leurs actions en se liant aux différents récepteurs des opioïdes qui appartiennent à trois grandes familles, les récepteurs μ , δ et κ , présents au niveau pré- et post-synaptique des neurones opioïdergiques et des neurones cibles.

Il y a quelques années, on pensait que tous les morphiniques endogènes avaient en commun la séquence des pentapeptides de leur extrémité N-terminale :

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, ou Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. La découverte de deux tétrapeptides, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ et Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, appelés respectivement endomorphine-1 et endomorphine-2, qui possèdent une haute affinité et une grande spécificité pour les récepteurs μ , rend ces affirmations caduques. L'affinité des différents morphiniques endogènes pour les récepteurs opioïdergiques est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Affinité des opioïdes endogènes pour les récepteurs opioïdergiques

	μ	δ	κ	ORL1
β -endorphine	+++	+++	+++	-
Leu-Enképhaline	+	+++	-	-
Met-Enképhaline	++	+++	-	-
Dynorphine	++	+	+++	-
Orphanine FQ/ nociceptine	-	-	-	+++
Endomorphine 1	++++	-	-	-
Endomorphine 2	++++	-	-	-

À la fin des années 80 des peptides opioïdes, appelés dermorphines et deltorphines, ont été découverts dans la peau de grenouille. Tous ces peptides d'amphibien possèdent un acide aminé dextrogyre en position 2.

5.3.1 Les enképhalines

En 1973, plusieurs laboratoires montrèrent de façon quasi simultanée l'existence d'une liaison à haute affinité, saturable et stéréo-spécifique d'agonistes ou d'antagonistes morphiniques tritiés sur des membranes cérébrales (Hughes et al. 1975a; Hughes et al. 1975b ; Kosterlitz and Hughes 1975; Pasternak et al. 1976; Simantov et al. 1976).

La démonstration que cette liaison se fait sur des récepteurs opiacés reposait sur deux arguments:

- la distribution régionale de ces sites de liaison est en accord avec la localisation des sites d'action centraux de la morphine,
- l'affinité des substances morphiniques pour ces sites de liaison est bien corrélée avec leur efficacité pharmacologique et leur activité analgésique. À partir de là, il était logique de supposer l'existence dans le système nerveux central de ligands naturels de ces récepteurs opiacés. L'existence de tels ligands endogènes fut démontrée en 1975 par Hughes et Kosterlitz qui les identifièrent dans le cerveau de porc comme deux pentapeptides : la Leu-Enképhaline et la Met-Enképhaline (Hughes et al. 1975b).

5.3.1.1 Localisations dans le système nerveux central

Les enképhalines sont distribuées de manière très hétérogène dans le cerveau. Les régions les plus riches sont, par ordre décroissant, les ganglions de la base, l'amygdale, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducale, le noyau interpedonculaire, le noyau parabrachial, le noyau du tractus solitaire, le noyau ambigu, l'area postrema et la substance noire. Viennent ensuite le cortex cérébral, l'hippocampe, l'ensemble du diencephale et le cervelet. On trouve aussi des enképhalines dans la neurohypophyse (Simantov et al. 1976; Kuhar 1978). C'est dans la corne dorsale de la moelle épinière que l'anatomie des neurones opioïdiques est la mieux connue. Les laminae I, II et V sont riches en neurones enképhalinergiques qui établissent essentiellement des contacts post-synaptiques avec les fibres afférentes primaires. Les fibres et les terminaisons nerveuses contenant ces peptides sont généralement localisées dans les mêmes régions que les corps cellulaires dont ils sont issus, ce qui indique que les neurones enképhalinergiques ont généralement des interneurons courts. Deux voies enképhalinergiques font exception :

- d'une part les fibres prenant leur origine au niveau du noyau caudé et putamen pour se projeter dans le glomus pallidus,
- d'autre part la voie hypothalamo-neurohypophysaire dont les corps cellulaires sont situés dans les noyaux supra-optiques et paraventriculaires de l'hypothalamus et dans les axones se projette dans la neuro-hypophyse. Dans ces

neurones neurosécrétoires, les enképhalines sont co-localisées avec l'ocytocine (Martin and Voigt 1981).

5.3.1.2 Localisations périphériques

On trouve des enképhalines dans les neurones du ganglion mésentérique, les neurones intrinsèques ou les cellules endocrines de l'intestin, le pancréas, le coeur, les poumons et la médullo-surrénale. Les enképhalines se fixent sur les récepteurs opiacés de type μ et δ (Lord et al. 1977).

5.3.1.3 Effets centraux

5.3.1.3.1 Effets analgésiques

L'inhibition complète de l'hydrolyse des enképhalines après administration concomitante d'acétorphan ou de bestatine, voire de kélatorphan (inhibiteur mixte de l'enképhalinase et de l'aminopeptidase M) conduit à des effets analgésiques dont la puissance est, en moyenne, de 30 à 40% inférieure à celle qui est obtenue avec la morphine, sauf dans les modèles de douleur chronique et dans les cas de stimulation nociceptive thermique. L'analgésie ainsi obtenue semble impliquer les récepteurs opioïdes μ au niveau des structures centrales et les récepteurs δ au niveau spinal. Le traitement chronique par des inhibiteurs des enképhalinases conduit à une analgésie sans tolérance et sans manifestation de dépendance physique et psychique.

5.3.1.3.2 Autres effets centraux

Les enképhalines sont capables, comme les morphiniques, de diminuer la vitesse de renouvellement de la noradrénaline et d'augmenter celle de la dopamine en agissant directement sur des récepteurs situés sur les terminaisons noradrénergiques ou dopaminergiques. À l'inverse, la stimulation des récepteurs dopaminergiques D2 exprimés à la surface des neurones enképhalinergiques striataux entraîne une augmentation de la libération et de la synthèse d'enképhaline. Ces résultats suggèrent une forte interaction entre enképhaline et neurones dopaminergiques (nigro-striataux et méso-corticaux-limbiques) impliqués dans diverses pathologies telles que la maladie de Parkinson, la schizophrénie ou les états dépressifs.

5.3.1.3.3 Effets périphériques

- au niveau intestinal, un inhibiteur de l'enképhalinase, l'acétorphan (Thiorphan®), a été mis sur le marché avec comme indication le traitement des états diarrhéiques. Contrairement au lopéramide (Imodium®), qui interagit préférentiellement avec les récepteurs μ , en inhibant le transit intestinal, l'inhibiteur de l'enképhalinase produit essentiellement une stimulation des récepteurs δ qui exerce une action antisécrétoire,

- au niveau de la glande médullo-surrénale : les enképhalines sont essentiellement libérées lors des états de stress, parallèlement à la sécrétion de β -endorphines par l'hypophyse,

- au niveau de la post-hypophyse : les enképhalines semblent exercer un effet inhibiteur sur la sécrétion de vasopressine (ADH) et de l'ocytocine. Il est vraisemblable que la sécrétion d'enképhaline agit à ce niveau comme signal de rétroaction (feed-back négatif) pour limiter la sécrétion hormonale.

5.3.2 La β -endorphine

La proopiomélanocortine (POMC) est le précurseur de plusieurs peptides à activités hormonales ou neurotransmettrices. L'hormone adrénocorticotrope (ACTH), les hormones mélanotropes (α , β et γ -MSH) et les endorphines ont été initialement isolées à partir d'extraits hypophysaires. La β -endorphine, identifiée par l'équipe de Guillemin, dérive de la β -lipotropine (β -LPH), peptide de 91 acides aminés possédant une activité lipolytique (Lazarus et al. 1976; Ling et al. 1976).

5.3.2.1 Localisations dans le système nerveux central

Dans le cerveau, deux populations de neurones synthétisent la POMC.

- le premier groupe est, chez le Rat, situé au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (noyau infundibulaire chez l'Homme).

- Un deuxième groupe est constitué de péricaryons localisés dans la portion commissurale du noyau du tractus solitaire. Les fibres issues de ces corps cellulaires innervent principalement les régions avoisinantes dans le bulbe rachidien.

5.3.2.2 Effets centraux

La β -endorphine a une forte affinité pour les récepteurs opioïdiques, μ et δ . Du point de vue physiologique, la β -endorphine mime la plupart des effets de la morphine: analgésie, catatonie, hypotension et dépression respiratoire. La β -endorphine exerce également des effets neuroendocriniens en stimulant la sécrétion de plusieurs hormones antéhypophysaires et notamment la prolactine via un blocage de la libération de dopamine (Gutstein and Akil 2001).

5.3.2.3 Effets périphériques

La β -endorphine diminue la mobilité et la sécrétion intestinale *via* l'activation des trois types de récepteurs opiacés μ , δ et κ . Les récepteurs μ exprimés directement sur les fibres lisses interviennent essentiellement sur la motilité alors que les récepteurs δ modifient essentiellement la fonction sécrétoire des entérocytes. Les sites κ seraient inhibiteurs de la libération d'acétylcholine dans les terminaisons parasympathiques.

5.3.3 Les dynorphines

En 1979, Goldstein et son équipe ont mis en évidence, dans l'hypophyse de porc, la présence d'un peptide de 13 acides aminés contenant la séquence Leu-enképhaline et ne dérivant pas de la β -lipotropine (Goldstein et al. 1979). Ce peptide opioïde, la dynorphine, inhibe puissamment les contractions du plexus mésentérique de l'iléon de cobaye d'où son nom dérivé du grec "*dynamis*" (pouvoir). Ensuite d'autres peptides de la même famille, les dynorphines A et B ont été purifiées à partir de lobe postérieur de l'hypophyse de boeuf. Plus tard, un polypeptide de 32 acides aminés, la dynorphine-(1-32) qui contient à la fois les séquences de dynorphine A et B a été purifiée. Plus récemment, les α - et β -néoendorphines ont été isolés. Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'isoler un fragment d'ADN codant un polypeptide de 256 acides aminés: la prodynorphine. L'analyse de la séquence de la prodynorphine a permis de montrer que les peptides de la famille des dynorphines ainsi que les néoendorphines sont issus de ce précurseur qui contient trois copies de la Leu-enképhaline.

5.3.3.1 Localisations dans le système nerveux central

Les neurones contenant des dérivés de la prodynorphine sont essentiellement localisés dans différentes aires du cortex cérébral, dans l'hypothalamus, dans le striatum, dans certains noyaux de l'hypothalamus et de l'hippocampe. On trouve également des cellules dynorphiniques dans la substance grise périaqueducale ainsi que dans de nombreuses autres régions du tronc cérébral. Dans la corne postérieure de la moelle, les neurones dynorphinergiques occupent surtout la couche I, ils établissent essentiellement des contacts post-synaptiques avec les fibres afférentes primaires (Khachaturian et al. 1985).

5.3.3.2 Localisations périphériques

En périphérie, des peptides issus de la prodynorphine ont été trouvés dans le système nerveux végétatif, la médullo-surrénale, le lobe antérieur de l'hypophyse et les organes de reproduction. Les dynorphines constituent les ligands endogènes des récepteurs opiacés de type κ . Il semble que les dérivés de la prodynorphine présentent une sélectivité d'autant plus marquée pour ces récepteurs qu'ils sont plus longs alors que certains effets des peptides plus courts tels que la dynorphine A-(1-8), pourrait résulter de leur interaction avec les autres classes de récepteurs opioïdiques (Zhang et al. 1998; Janecka et al. 2004).

5.3.3.3 Effets centraux

La localisation des dynorphines et des récepteurs κ dans la corne postérieure de la moelle ainsi que dans la substance grise périaqueducale et le noyau du raphé suggèrent leur participation dans la régulation des phénomènes nociceptifs.

5.3.3.4 Effets périphériques

Dans les situations d'inflammation locale, l'application d'agonistes κ est capable d'induire une analgésie dans la région concernée. Certains arguments tendent à montrer que ces peptides sont libérés par des cellules du système immunitaire. Les systèmes dynorphiniques participent également au contrôle de différentes fonctions physiologiques : respiration, pression artérielle et rythme

cardiaque, sécrétion hormonale hypophysaire et prise alimentaire (Janecka et al. 2004).

5.3.4 Endomorphines

En 1997, le groupe de Zadina a mis en évidence une séquence biologique Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ dans le cerveau bovin (Zadina et al. 1997). Cette séquence a été retrouvée également dans le cortex humain par la même équipe (Hackler et al. 1997). Ce nouveau peptide appelé endomorphine-1 présente une affinité remarquable pour les récepteurs μ (360 pM) avec une sélectivité 4000 fois plus grande pour les récepteurs μ que pour les récepteurs δ et 15000 fois plus importante que pour les récepteurs κ . Ce peptide a montré une efficacité sur les récepteurs μ particulièrement convaincante dans les essais sur le l'iléon de hamster. Ce peptide possède également une activité analgésique in vivo dans le test de l'immersion de la queue par les deux équipes. Un deuxième peptide, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, différent d'un acide aminé de l'endomorphine-1, nommé endomorphine-2 et présentant des propriétés très similaires à son homologue a également été identifié par la même équipe. Le précurseur de ces deux peptides opioïdiques endogènes n'a toujours pas été identifié.

5.3.4.1 Structure et activité

La structure de ces deux peptides est différente de celle des autres opioïdes endogènes qui présentent tous une séquence Tyr-Gly-Gly-Phe à leur extrémité N-terminale. La séquence N-terminale de l'endomorphine-1 est composée de 2 résidus pharmacophoriques, Tyr et Trp (dans l'endomorphine-2, Trp est remplacé par Phe), les groupements amine et phénole de la Tyr et l'anneau aromatique du Trp (ou Phe) sont essentiels pour l'interaction avec le récepteur μ . La séquence des endomorphines comprend également un coude proliné qui lie les résidus pharmacophores. Plusieurs équipes ont publié une étude comparative de l'endomorphine-1 afin d'identifier sa conformation et ses attributs responsables de sa sélectivité pour les récepteurs μ (Podlogar et al. 1998; Paterlini et al. 2000; Keller et al. 2001).

5.3.4.2 Distribution

Des études radioimmunologiques et immunocytochimiques ont révélé la distribution des endomorphines dans les systèmes nerveux centraux chez l'Homme, les bovidés et les rongeurs (Hackler et al. 1997; Martin-Schild et al. 1997; Schreff et al. 1998; Martin-Schild et al. 1999; Pierce and Wessendorf 2000). Les endomorphines sont abondantes au niveau de la strie terminale, de la substance grise périaqueducule, du locus ceruleus, du noyau parabrachial, et du noyau du tractus solitaire. Il existe cependant quelques différences de distribution entre les deux peptides. L'endomorphine-1 est distribuée largement et abondamment au niveau du cerveau et du tronc cérébral, plus particulièrement au niveau du noyau accumbens, du cortex, de l'amygdale, du thalamus, de l'hypothalamus, du striatum et des ganglions spinaux (Schreff et al. 1998; Martin-Schild et al. 1999). L'endomorphine-2 est plus abondante au niveau de la moelle épinière et dans la partie inférieure du tronc cérébral (Martin-Schild et al. 1999; Pierce and Wessendorf 2000). On la retrouve également au niveau de l'hypothalamus, du noyau du tractus solitaire et des fibres variqueuses de la substance gélatineuse de la corne postérieure de la moelle épinière et de façon moins importante dans le noyau accumbens, la substance noire, le noyau du raphe magnus, l'aire tegmentale ventrale, les noyaux du pont et l'amygdale. La différence de distribution de ces deux peptides semble indiquer qu'ils pourraient avoir deux précurseurs différents ou un précurseur commun pouvant être dissocié de deux manières différentes.

La distribution des endomorphines dans le système nerveux central est assez similaire à celle des autres peptides opioïdes. Cependant, dans le cas de l'endomorphine-2, deux différences majeures existent. À la différence des enképhalines et des dynorphines, l'endomorphine-2 est retrouvée au niveau de l'hippocampe et du striatum similairement à la β -endorphine.

En dehors du système nerveux central, on retrouve ces deux peptides dans deux organes lymphoïdes, le thymus et la rate mais aussi dans certaines cellules (monocytes/macrophages, lymphocytes et polynucléaires neutrophiles) participant aux réactions inflammatoires (Mousa et al. 2002).

5.3.4.3 Effets centraux

L'administration intrathécale d'endomorphines induit une analgésie, bloquée par l'injection préalable d'antagonistes des récepteurs μ . Cette analgésie ne semble pas faire intervenir de composante sérotoninergique (Ohsawa et al. 2001a; Hung et al. 2003).

L'injection supraspinale (i.c.v.) d'endomorphine-2 et non d'endomorphine-1 induit une inhibition dans le test de « tail-flick » qui est bloquée par l'administration préalable d'antisérum contre la dynorphine A-(1-17) et aussi par la norbinaltomorphimine, un antagoniste spécifique des récepteurs κ . Il est également intéressant de noter que les effets analgésiques de l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'endomorphine-2 sont abolis par l'injection intrathécale préalable d'antisérum contre la Met-enképhaline et le naltriben (Tseng et al. 2000). Ces expériences indiquent que l'injection supraspinale d'endomorphine-2 induit une analgésie par l'intermédiaire du relargage de plusieurs acteurs, la dynorphine A-(1-17) agissant sur les récepteurs opioïdiques κ et la Met-enképhaline stimulant les récepteurs δ 2.

5.3.4.4 Effets périphériques

L'administration périphérique d'endomorphines produit des effets analgésiques *via* la stimulation des récepteurs opioïdiques μ et κ au niveau des fibres afférentes primaires (Kolesnikov and Pasternak 1999; Nozaki-Taguchi and Yaksh 1999; Craft and Lee 2005) mais les mécanismes exacts en cause n'ont pas été clairement élucidés.

5.3.4.5 Effets sur l'activité locomotrice

Fichna et collaborateurs ont démontré que l'administration i.c.v. d'endomorphines n'induit pas les mêmes effets délétères que la morphine sur l'activité locomotrice des rongeurs (Fichna et al. 2007b).

5.3.5 Fonctions des neurones opioïdiques

Il faut commencer par rappeler que les récepteurs opioïdiques sont localisés à des endroits stratégiques pour effectuer un contrôle central et périphérique des voies nociceptives. Ainsi les opioïdes peuvent produire une analgésie par action à trois niveaux différents des voies de propagation du signal nociceptif : au niveau central, au niveau de la moelle épinière et en périphérie. Ces mécanismes sont discutés ici.

5.3.5.1 Action au niveau cellulaire

Les récepteurs des opioïdes appartiennent à la famille des récepteurs qui sont ancrés dans les membranes plasmiques par sept segments hydrophobes et sont couplés à des protéines G de type $G_{i/o}$. Ces protéines G sont capables de lier les nucléotides guanyliques, et assurent la transduction du signal vers la machinerie intracellulaire responsable de la réponse biologique. Les récepteurs des opioïdes, de types μ , δ ou κ , peuvent être couplés à plusieurs effecteurs par l'intermédiaire de protéines G variées. Ainsi, ils inhibent l'adénylate cyclase et donc diminuent la concentration intracellulaire du second messenger qu'est l'AMPc, ils permettent également l'ouverture de canaux potassiques entraînant une hyperpolarisation cellulaire post-synaptique et ainsi inhibent l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique. L'ensemble de ces mécanismes au niveau cellulaire se traduit par une hyperpolarisation membranaire et produit une réduction de l'excitabilité neuronale qui aboutit à une modulation inhibitrice de la transmission de l'information nociceptive à l'origine de leurs effets (Janecka et al. 2004).

5.3.5.2 Mécanisme d'action central

Au niveau cérébral, les récepteurs opioïdiques se retrouvent principalement au niveau des régions impliquées dans la transmission et la modulation du message nociceptif, en particulier les voies descendantes inhibitrices mais aussi sur les voies ascendantes de la douleur

5.3.5.3 Mécanisme d'action spinal

Les récepteurs μ , κ et δ sont retrouvés en grande concentration au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Mansour et al. 1995). Plus spécifiquement, les récepteurs opioïdiques sont tous localisés au niveau du ganglion rachidien (avec possibilité de migration vers les terminaisons périphériques et centrales des neurones afférents primaires) et de la corne dorsale de la moelle épinière. Certains auteurs ont montré que les fibres afférentes primaires (fibres C et A δ) d'animaux témoins comportent 20% de récepteurs μ , 15% de récepteurs δ et 10% de récepteurs κ (Ji et al. 1995). Par ailleurs, deux récepteurs opioïdiques, voire même trois, peuvent coexister au niveau des neurones afférents primaires. Il existe également des interactions entre les récepteurs opioïdiques dans l'expression d'un récepteur par rapport à un autre comme démontré entre les récepteurs μ et δ (Morinville et al. 2004). La présence de ces récepteurs à des endroits stratégiques de la modulation de la douleur permet l'inhibition de la transmission des impulsions nociceptives à travers la moelle épinière, par exemple par inhibition de la libération de la substance P par les neurones de la corne dorsale de la moelle.

Ainsi, au niveau spinal les opioïdes interagissent au niveau de certaines régions clefs, comme la région rétroventrale qui participe ainsi aux effets analgésiques centraux des opioïdes (Mitchell et al. 1998). Les opioïdes possèdent également une action indirecte par stimulation des fibres inhibitrices GABAergiques qui bloquent ainsi la libération de substance P ou de glutamate (Heinricher et al. 1991; McGowan and Hammond 1993b; a; Tillement and Albengres 2001). Les autres substances impliquées dans les effets analgésiques des opioïdes sont la sérotonine (5-HT) (Kiefel et al. 1992a; b), les acides aminés excitateurs, L-Glu ou encore le NMDA (Aimone and Gebhart 1986; van Praag and Frenk 1990; Spinella et al. 1996), et la neurotensine (Urban and Smith 1993). Par exemple, l'analgésie induite par le DAMGO, un puissant agoniste spécifique des récepteurs μ , injecté i.c.v. est médiée par le relargage de noradrénaline et de sérotonine qui interagissent respectivement avec les récepteurs adrénergiques α_2 et 5-HT au niveau spinal (Tseng and Tang 1990; Tseng and Collins 1991). L'administration de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ou de 5,7 dihydroxytryptamine (5,7-DHT), ou encore le blocage des récepteurs

adrénergiques α_2 ou 5-HT par prétraitement intrathécale par la yohimbine et le methysergide diminue l'analgésie induite par l'administration de morphine i.c.v. (Zhong et al. 1985; Suh et al. 1989; Sawynok et al. 1991; Suh et al. 1992).

5.3.5.4 Mécanisme d'action périphérique

Les récepteurs opioïdiques sont également localisés sur les terminaisons périphériques des neurones afférents primaires. Les opioïdes peuvent ainsi inhiber la libération dépendante du calcium de composés nociceptifs et pro-inflammatoires (comme la substance P) à partir des terminaisons sensibles des neurones périphériques.

Les effets analgésiques périphériques des opioïdes ont surtout été observés dans des modèles d'inflammation périphérique ou dans des modèles de neuropathie périphérique. Ainsi le processus inflammatoire augmente le transport axonal des récepteurs opioïdiques comme cela a également été décrit après des lésions des neurones afférents primaires.

Par ailleurs, les ligands opioïdes endogènes sont présents au niveau des cellules immunitaires dans le foyer inflammatoire. Dans des conditions de stress ou lors de libération de cytokines, les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement et induire ainsi une analgésie. Les récepteurs opioïdiques des cellules immunitaires peuvent inhiber les lymphocytes et par conséquent diminuer la synthèse de cytokines. Les récepteurs κ seraient plus particulièrement impliqués dans ces effets. De plus, il a été démontré que les agonistes κ présentent des propriétés analgésiques périphériques dans des modèles de douleur viscérale, ces propriétés analgésiques sont majorées en situation inflammatoire (Riviere 2004).

Beaucoup de neurones nociceptifs (spécifiques ou à convergence) contiennent des enképhalines. Il n'est donc pas surprenant que les stimulations nociceptives aiguës provoquent une libération de peptides opioïdes dans la moelle épinière, et que les neurones opioïdiques spinaux soient profondément modifiés dans les modèles animaux de douleur chronique. Toutefois, le rôle fonctionnel de ces neurones opioïdiques spinaux est complexe et imparfaitement connu. Ainsi, on observe une augmentation des concentrations spinales des peptides dérivés de la proenképhaline A et de la prodynorphine, et des ARN messagers correspondants,

dans la corne dorsale en cas d'inflammation périphérique (modèle de rat polyarthritique). Cependant, d'autres données montrent une diminution marquée de la libération spinale des peptides dérivés de la proenképhaline A chez des rats souffrant de douleurs chroniques inflammatoires. Bien que la plupart des neurones enképhalinergiques de la corne dorsale soient des inter-neurones, certaines cellules opioïdergiques sont à l'origine de projections ascendantes.

5.4 Les peptides anti-opioïdes

5.4.1 Généralités

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le processus de tolérance pourrait être supporté par des réseaux neuronaux capables de s'opposer aux actions des opioïdes, voire d'induire des effets opposés, tels que les symptômes végétatifs du syndrome de sevrage associé à la dépendance. Dans cette perspective qui crée un certain continuum physiologique entre les phénomènes de tolérance et de dépendance, le système nerveux central pourrait synthétiser et libérer des molécules, que l'on peut qualifier d'anti-opioïdes, à la suite de la prise de toute substance capable de stimuler les récepteurs des opioïdergiques. Deux théories peuvent servir de support conceptuel pour expliquer le développement de la tolérance et de la dépendance aux substances opiacées :

-Théorie de l'adaptation homologue : Elle correspond à l'adaptation des systèmes opioïdes endogènes en réponse à la stimulation répétée des récepteurs des opioïdes eux-mêmes :

- développement d'une hyposensibilité des récepteurs des opioïdes, -
- altération des systèmes de transduction associés à ces récepteurs, -
- modification des processus de synthèse,
- production de peptides opioïdes antagonistes.

- Théorie de l'adaptation hétérologue : Elle repose sur l'existence au sein du système nerveux de molécules endogènes à spectre d'activité anti-opioïde dont la mise en jeu pourrait être induite par la stimulation des récepteurs des opioïdes. Une théorie séduisante : "L'Opponent Process Theory" ou Théorie des Processus d'Opposition, proposée il y a une vingtaine d'années par Solomon à propos des processus motivationnels (Solomon 1980). Cette théorie propose que:

- Lors de la première présentation d'un stimulus unique, deux types de réponses opposées a et b sont déclenchés mais la réponse de type a est largement prédominante ; il apparaît une réponse b mineure, pouvant échapper à l'observation bien que la réponse globale soit la résultante des réponses a et b.

- À la suite de la répétition du stimulus, la réponse de type a n'est pas changée mais la réponse de type b est progressivement amplifiée et dure plus longtemps. La réponse globale observée est de plus en plus faible (tolérance) lors d'un arrêt brutal du stimulus, une réponse opposée peut même apparaître. Appliquée au cas de la tolérance aux effets analgésiques de la morphine, cette théorie propose que la stimulation des récepteurs des opioïdes par la morphine pourrait entraîner l'activation concomitante des systèmes inhibiteurs (processus a : analgésie) et des systèmes facilitateurs (processus b : hyperalgésie) de la nociception. La réponse observée serait la résultante du fonctionnement simultané de ces deux systèmes opposés.

Pour être définie comme anti-opioïde, une molécule, en l'occurrence un peptide, doit répondre à plusieurs critères d'après (Simonnet and Rivat 2003).

1° critère : l'administration d'un peptide anti-opioïde doit atténuer les effets des opioïdes, voire induire par elle-même des effets opposés à ceux des substances opioïdes ;

2° critère : un peptide anti-opioïde doit être présent au sein de neurones dans le système nerveux central et répondre à l'ensemble des critères définissant un neurotransmetteur. Les récepteurs d'un tel peptide doivent être spécifiques de ce peptide et en particulier différents des récepteurs des opioïdes, indiquant que ce peptide n'est pas un antagoniste endogène de ces récepteurs mais le véritable ligand d'un réseau neuronal individualisé ;

3° critère : la stimulation des récepteurs des opioïdes doit provoquer la libération du peptide anti-opioïde dans l'espace extracellulaire, de manière dose-dépendante ;

4° critère : l'administration d'un antagoniste spécifique des récepteurs de ce peptide, ou sa neutralisation par l'injection intracérébrale d'un anticorps dirigé contre ce peptide, doit :

- potentialiser certains des effets pharmacologiques des peptides opioïdes ;

- s'opposer au développement de la tolérance et de la dépendance ou en réduire partiellement l'expression (syndrome de sevrage). Plusieurs peptides remplissent un ou plusieurs de ces critères, parmi lesquels : la Cholécystokinine (CCK), le Neuropeptide FF, les peptides de la famille du MIF et la Nociceptine (ou Orphanine FQ).

- L'hyperactivité de systèmes " anti-opioïdes " a également été incriminée pour rendre compte de la faible sensibilité des douleurs neuropathiques aux opioïdes. Les morphinomimétiques endogènes ou exogènes affectent l'activité des neurones qui sont porteurs de récepteurs des opioïdes, participant ainsi à un système que l'on pourrait qualifier d'homéostatique, tendant à réduire les effets des opioïdes. Ainsi, les opioïdes activeraient des neurones qui libéreraient des neuropeptides doués de propriétés anti-opioïdes. Selon ce concept, les effets des opioïdes seraient, en réalité, toujours plus faibles qu'ils ne seraient en l'absence de tels systèmes qui contrecarrent leurs actions (existence d'un tonus anti-opioïde). Des propriétés anti-opioïdes ont été attribuées à différents peptides, parmi lesquels on peut citer le TRH, la somatostatine, la calcitonine, l'ACTH, l' α -MSH et la vasopressine. Toutefois, ce sont les propriétés anti-opioïdes du CCK du NPFF, du MIF et de ses dérivés, et, plus récemment de la nociceptine, qui sont les mieux établies.

- Cholécystokinine-8 (CCK): Asp-Tyr(S03H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂
- Neuropeptide FF (NPFF): Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂
- Nociceptine: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln
- Peptides de la famille du MIF (Melanocyte Inhibiting Factor)
 - MIF-1: Pro-Leu-Gly-NH₂
 - Tyr-MIF-1: Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂
 - Tyr-W-MIF-1: yr-Pro-Trp-Gly-NH₂
 - Tyr-K-MIF-1: yr-Pro-Lys-G7y-NH₂

Le blocage de l'action de certains peptides anti-opioïdes peut :

(i) réduire la tolérance et atténuer les manifestations du syndrome de manque. Ces observations ont conduit à formuler l'hypothèse que l'hyperactivité compensatrice des systèmes anti-opioïdes en réponse à une administration chronique d'opioïdes pourrait être responsable, pour une part, des phénomènes de tolérance et de

dépendance. De même, des variations de l'activité d'un système anti-opioïde pourrait expliquer la plus ou moins grande efficacité antalgique des opioïdes.

(ii) augmenter l'efficacité antalgique des opioïdes dans certains types de douleurs résistantes (neuropathies). Pour le moment, seules des altérations du contrôle CCK-ergique de la nociception ont été proposées comme étant à l'origine de la faible sensibilité des douleurs neuropathiques aux opioïdes. De fait, après ligature du nerf sciatique chez le Rat, on constate une induction de l'expression du gène du précurseur du CCK dans les ganglions des racines dorsales et d'une augmentation de la libération spinale de CCK, qui s'opposerait à l'action antinociceptive des opioïdes. Chez les animaux lésés, on constate un accroissement de l'aptitude des antagonistes des récepteurs CCK-B à potentialiser l'analgésie morphinique.

Deux types de systèmes anti-opioïdes endogènes ont pu être mis en évidence.

- Le premier type regroupe les peptides opioïdes ou leurs dérivés, qui sont capables de se lier aux récepteurs des opioïdes. C'est le cas du fragment 1-27 de la β -endorphine, qui peut antagoniser les effets antinociceptifs et hypothermiques induits par la β -endorphine-(1-31) ou la dynorphine A-(1-13). Ce peptide est capable de réduire différents effets observés après stimulation des récepteurs des opioïdes μ .

- Le second type concerne des composés qui n'interagissent pas avec les récepteurs des opioïdiques. Les mieux connus sont les peptides MIF-1, Tyr-MIF-1, la cholécystokinine (CCK), les peptides de la famille du FMRF-amide, et la nociceptine.

5.4.2 Les cholécystokinines (CCK)

Les systèmes CCK et opioïdes sont impliqués, souvent de manière opposée, dans divers processus physiologiques, comme le contrôle de la douleur, la régulation de l'humeur, le tonus psychique, la mémoire, ou encore les fonctions respiratoires et cardio-vasculaires. La CCK est une hormone gastro-intestinale également présente dans le système nerveux central (SNC). Ce peptide y est très largement distribué, souvent colocalisé avec de nombreux autres neurotransmetteurs. Diverses formes de CCK ont été mises en évidence, parmi lesquelles l'octopeptide C-terminal sulfaté (CCK8) qui est majoritaire dans le SNC. D'autres peptides, comme la forme non sulfatée de la CCK8, le CCK5 et le CCK4, ont également été identifiés dans le

cerveau. Les études de "binding" ont conduit à mettre en évidence au moins deux types de récepteurs : les récepteurs CCK-B, prédominant dans le cerveau, et les récepteurs CCK-A, abondants dans les tissus périphériques, mais également présents dans quelques régions du SNC. Les études anatomo-histologiques ont montré :

- d'une part que la distribution de la CCK et de ses récepteurs est superposable à celle des enképhalines et des récepteurs des opioïdes ;
- d'autre part qu'ils se trouvent dans des régions impliquées dans le contrôle de la transmission des messages nociceptifs (qu'elles soient spinales ou supraspinales) et dans le contrôle de l'humeur comme le système limbique.

De nombreux arguments suggèrent que la CCK est un antagoniste endogène du système opioïde intervenant dans le contrôle des messages nociceptifs. L'utilisation conjointe d'inhibiteurs de la dégradation des enképhalines et d'antagonistes des récepteurs de la CCK a grandement facilité l'étude des fonctions physiologiques de ces deux systèmes peptidergiques. Ces travaux montrent que l'activation des récepteurs CCK-B est capable de moduler négativement le système opioïdergique, au contraire de l'activation des récepteurs CCK-A qui permet une potentialisation des réponses antinociceptives. Il apparaît que les opioïdes endogènes et le CCK font partie d'un système homéostatique où l'activation de l'un des deux systèmes entraîne celle de l'autre, qui en retour, s'oppose aux effets du premier. Ainsi, en même temps qu'ils déclenchent une analgésie, les opioïdes activent un système antiopioïde par l'intermédiaire de récepteurs $\delta 2$. Cette observation ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques basées sur l'administration d'antagonistes $\delta 2$, à la place des antagonistes CCK-B. Ainsi, des antagonistes $\delta 2$ pourraient avantageusement être associés à un traitement morphinique, non seulement pour s'opposer au développement éventuel d'une tolérance à l'alcaloïde, mais aussi pour augmenter son efficacité analgésique. L'analgésie induite par les opioïdes (endogènes ou exogènes) est réduite par la CCK (endogène ou exogène) agissant sur des récepteurs CCK-B. Il apparaît que cet équilibre pourrait être rompu à la suite d'un traitement chronique avec un opioïde. Sur la base des connaissances actuelles, deux approches pourraient être proposées :

- la première consisterait à administrer des antagonistes des récepteurs CCK-B ou $\delta 2$ conjointement avec la morphine.

- la seconde serait d'adjoindre à la morphine des agonistes CCK-A de façon à activer les systèmes opioïdes endogènes. De ce point de vue, il est à noter que la CCK, *via* son action sur des récepteurs CCK-A, est capable de prévenir le développement de la tolérance aux effets antinociceptifs de la morphine. Au total, il apparaît que les interactions CCK-opioïdes ne se limitent pas au domaine de la nociception. Ainsi, dans le syndrome de sevrage expérimental aux opioïdes, l'activation des systèmes cholécystokinergiques semble plus liée au stress qu'au blocage des récepteurs μ par la naloxone. Cette observation renforce l'idée que moduler l'activité des systèmes cholécystokinergiques devrait permettre non seulement d'agir sur la composante sensorielle de la douleur, mais également sur sa composante émotionnelle.

5.4.3 Le Neuropeptide FF (NPFF)

Le neuropeptide FF (NPFF) est un peptide formé de huit acides aminés (Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂). Bien que la structure de ce peptide rappelle celle d'une enképhaline, son injection par voie intrathécale chez le rat atténue les effets analgésiques induits par la morphine. A l'aide d'un immunosérum anti-FMRFamide, Yang et Majane isolèrent et séquencèrent deux peptides à partir du cerveau de boeuf (Majane and Yang 1987):

- d'une part, un octopeptide : le NPFF, tout d'abord référencé comme F8Fa
- d'autre part, un octodécapeptide, le NPAF, référencé au départ comme A18Fa. À la différence du FMRFamide, le peptide des invertébrés, ces deux peptides ne sont pas seulement capables, de s'opposer aux effets analgésiques de la morphine mais d'induire par eux-mêmes (i. c.v.) un abaissement du seuil nociceptif chez le Rat (hyperalgésie). Le NPFF possède une très faible affinité pour les récepteurs μ , δ et κ . Il ne se comporte donc nullement comme un antagoniste des récepteurs des opioïdes. Son action s'exerce par l'intermédiaire de sites de liaison spécifiques. Les propriétés pharmacologiques des analogues du NPFF [(1DMe)Y8Fa] montrent que la modulation de l'activité antinociceptive des opioïdes et l'action pronociceptive du NPFF ne sont pas forcément distinctes et indépendantes mais se manifestent différemment suivant : la dose du peptide employée, le test utilisé, le niveau d'activité du système opioïdergique. Comme nous l'avons signalé, le NPFF, comme

le NPSF potentialisent les courants générés par les canaux ASIC3 homomériques et les hétéromères ASIC3/2a (Deval et al. 2003; Lingueglia 2007).

5.4.4 La nociceptine et son récepteur

La découverte de la nociceptine ou orphanine FQ est l'exemple d'une démarche de pharmacologie inversée, allant de l'identification du gène d'une cible orpheline, à celle son effecteur naturel (Chen et al. 1994; Meunier 1997). Nous pensons qu'il existe des effecteurs endogènes des canaux ASIC, cependant, ils n'ont toujours pas été mis en évidence.

5.4.4.1 Le récepteur ORL1 (“ Opioid Receptor-Like 1 ”)

C'est en cherchant à cloner des récepteur des opioïdiques, que plusieurs laboratoires ont isolé une séquence génétique jusqu'alors inconnue, codant une protéine ORL1 dont la structure primaire, caractéristique d'un récepteur de couplé aux protéines $G_{i/o}$, est analogue à celles des récepteurs des opioïdiques. En termes d'homologie de séquence, ORL1 est à peu près équidistant (65%) des trois types de récepteurs μ , δ , κ (Meunier 1997).

5.4.4.2 L'effecteur naturel de la cible orpheline : la nociceptine

Le récepteur ORL1 ayant une structure apparentée à celle des récepteurs des opioïdes endogènes, on pouvait penser que le ligand endogène d'ORL1 était aussi de nature peptidique. À partir de ces hypothèses, deux équipes ont isolé, l'une à partir de cerveaux de rat, l'autre à partir d'hypothalamus de porc, la nociceptine, qui est un peptide dont la séquence de 17 acides aminés présente quelques homologies avec celle de la dynorphine A.

5.4.4.3 Propriétés de la nociceptine

L'administration i.c.v. répétée d'un oligonucléotide antisens, fait apparaître, chez la Souris, un allongement du temps de réaction à une stimulation nociceptive thermique cutanée (épreuve de la plaque chaude), traduisant une hypoalgésie. Inversement, l'injection i.c.v. de nociceptine induit un état d'hyperalgésie se traduisant

par une diminution très significative le temps de réaction des animaux dans les épreuves de la plaque chaude et du retrait de la queue. On tend à considérer aujourd'hui, que la nociceptine est :

- hyperalgésique / anti-opioïde au niveau supraspinal
- analgésique / antinociceptive au niveau spinal.

Contrairement au NPFF, la nociceptine ne précipite pas le syndrome de sevrage chez le rat morphino-dépendant et n'est pas addictive (test de préférence de place). Au niveau supraspinal, la nociceptine affecte les performances locomotrices, diminue les capacités d'apprentissage, stimule la prise de nourriture et régule la libération d'hormones hypophysaires. Elle est active par voie intraveineuse, une propriété qui a permis de mettre en évidence ses actions périphériques, vasorelaxante, diurétique et antinatriurétique. Elle joue probablement aussi un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (Chiou et al. 2007).

5.4.4.4 Les peptides de la famille du MIF (*Melanocyte Inhibiting Factor*)

Le MIF-1 (Pro-Leu-Gly-NH₂) est le tripeptide carboxy-terminal de l'ocytocine, dont il provient à la suite de coupures successives de liaisons peptidiques par une exopeptidase. Il est pourvu de certaines propriétés anti-opioïdes, comme d'autres peptides de structure apparentée Tyr-MIF-1 et Tyr-W-MIF-1, également présents dans le système nerveux central, mais qui ne sont pas issus du précurseur de l'ocytocine. Ces peptides :

- réduisent l'analgésie morphinique et certaines formes d'analgésie induite par le stress ;
- diminuent la tolérance au lévorphanol ;
- provoque des signes d'abstinence chez des souris rendues dépendantes vis-à-vis de cet opioïde ou de la morphine (Kastin et al. 1994).

Cependant, la caractéristique la plus remarquable des peptides de cette famille, qui l'oppose au CCK, au NPFF et à la nociceptine, est de pouvoir interagir directement, comme agonistes partiels, avec les récepteurs μ . Ils peuvent se comporter comme des antagonistes à basses concentrations et, au contraire, comme des agonistes à des concentrations plus élevées. Au total le CCK, le NPFF et la nociceptine n'exercent pas seulement des actions anti-opioïdes, ils présentent aussi

des effets morphinomimétiques (bloqués par la naloxone). Contrairement aux peptides de la famille du MIF, aucun de ces trois peptides n'interagit directement avec les récepteurs des opioïdes. Si le bénéfice que le système opioïde procure à l'individu est facilement concevable, le rôle des peptides anti-opioïdes est, à priori, beaucoup moins clair. On pense qu'il est utile pour l'organisme de déclencher de manière compensatrice une activité anti-opioïde pour rétablir une sensation douloureuse normale. Cette capacité d'augmenter la perception de la douleur s'explique par un processus homéostatique du fonctionnement du système nerveux. Les études pharmacologiques indiquent que les anti-opioïdes se comportent surtout comme des modulateurs des fonctions des opioïdergiques endogènes. En effet, certains anti-opioïdes, tel que le NPFF, sont capables d'induire une analgésie très puissante au niveau spinal. S'il se confirme chez l'Homme, ce mécanisme d'action pourrait permettre d'obtenir une analgésie très efficace, sans générer les effets secondaires liés à l'administration d'opiacés exogènes. Par ailleurs, des avancées thérapeutiques viendront probablement de molécules agissant comme antagonistes des anti-opioïdes.

Les effets de PcTx1 injectée i.c.v. ou i.t. sont similaires à ceux de certains peptides que nous avons décrits précédemment, en particulier ceux du NPFF et l'endomorphine-2 injectés dans le liquide céphalorachidien spinal. Ceci est l'argument supplémentaire encourageant l'idée qu'il doit exister d'autres peptides endogènes capables de moduler l'activité des canaux ASIC et de produire les effets majeurs sur la douleur que nous avons observés en inhibant les canaux ASIC1a par la Psalmotoxine 1.

6 Article

6.1 Introduction

Historiquement, les venins ont permis de mieux comprendre et mieux caractériser les canaux ioniques à la fois dans leurs fonctions cellulaires mais aussi dans leurs fonctions physiologiques. Nous avons étudié *in vivo* les effets d'un bloqueur spécifique d'ASIC1a, la toxine d'araignée PcTx1. J'ai débuté cette étude en m'intéressant aux effets électrophysiologiques du peptide injecté dans le liquide céphalorachidien de souris au niveau du ventricule latéral. Au départ, cette étude a été lancée car nous pensions que le blocage d'ASIC1a induisait des crises épileptiques : en effet des souris injectées présentent des signes d'hyperexcitabilité, à savoir, un enraidissement de la queue et des vibrations de vibrisses dans les minutes suivant l'injection. Aucun effet n'est observé lors de l'injection dans les tissus périphériques, en condition normale ou inflammatoire, ni lors de l'injection systémique du peptide PcTx1. Lorsque Wemmie et al publièrent la première description phénotypique de souris invalidées pour le gène d'ASIC1a, ils indiquaient que l'absence de ce canal ne semblait pas avoir d'incidence sur la perception nociceptive des souris (Wemmie et al. 2002). Ceci nous a conduit à étudier les effets du blocage spécifique d'ASIC1a dans un modèle de douleur thermique sur des souris sauvages. Nous avons ainsi montré que l'injection de PcTx1 est capable de produire une analgésie chez la Souris lorsqu'elle est injectée dans le liquide céphalorachidien. Cet effet, dose-dépendant, méritait d'être étudié dans d'autres modèles de douleur. En observant les effets sur les souris de la morphine, que nous utilisons comme contrôle positif des effets analgésiques de PcTx1, nous nous sommes rendu compte que ce que nous prenions pour des effets de l'hyperexcitabilité neuronale n'étaient en fait que des effets similaires à ceux que l'on observe chez la Souris injectée avec de la morphine. Ceci a été pleinement confirmé par les enregistrements électroencéphalographiques des souris injectées intracérébroventriculairement avec PcTx1, enregistrements dont l'analyse n'est pas en pas en faveur de crises pharmaco-induites.

La similitude des effets cliniques de la morphine et de PcTx1 nous a rapidement mis sur la piste d'un effet analgésique médié par l'activation des

récepteurs opioïdiques. Nous avons confirmé ce point en observant la réversion et l'antagonisation des effets analgésiques de PcTx1 par un antagoniste des récepteurs μ opioïdiques, la naloxone. Ensuite, nous avons utilisé d'autres antagonistes plus spécifiques des différents récepteurs opioïdiques afin de caractériser les effecteurs de cet effet analgésique. L'obtention d'un spectre d'activation des récepteurs μ et δ après injection intrathécale de PcTx1 suggère qu'un ou plusieurs peptides opioïdiques endogènes sont relargués consécutivement à l'injection de PcTx1.

La cible moléculaire de PcTx1 responsable des effets analgésiques aurait pu ne pas être ASIC1a malgré l'abondance des résultats électrophysiologiques déjà obtenus montrant que PcTx1 n'interagit pas avec les autres membres de la famille des canaux ASIC. D'une part, des études *in vitro* ont permis d'éliminer un effet de PcTx1 sur les canaux potassiques, sodiques et calciques mais aussi sur les récepteurs opioïdiques. D'autre part, les effets analgésiques de PcTx1 sont identiques chez les souris injectées avec un oligonucléotide antisens spécifique d'ASIC1a. Ceci démontre bien que les effets que nous avons observés sont bien en rapport avec l'inhibition d'ASIC1a par PcTx1. Cependant, nous sommes toujours dans l'attente des résultats de l'effet de PcTx1 sur les souris invalidées pour le gène ASIC1a.

Comme nous avons mis en évidence une activation des récepteurs opioïdiques μ et δ après injection intrathécale de PcTx1, il nous fallait déterminer quel(s) étai(en)t le(s) peptide(s) endogènes responsables. Nous avons obtenu plusieurs souris invalidées pour les précurseurs des peptides opioïdes endogènes. L'absence d'effet analgésique observé chez les souris invalidées pour le gène précurseur des enképhalines révèle que le blocage d'ASIC1a au niveau spinal entraîne une analgésie due au relargage d'enképhalines.

Quelques publications montrent que l'endomorphine-2 injectée dans le liquide céphalorachien spinal ou encore l'injection i.t. d'analogue du NPFF entraîne un relargage de Met-enképhaline ((Ballet et al. 1999; Ohsawa et al. 2001b). Comme le précurseur de l'endomorphine-2 n'est pas connu, il n'existe pas de souris n'exprimant pas ce peptide, mais *in vitro*, ce peptide n'a pas d'effet sur les canaux ASIC1a tout comme l'endomorphine-1 et les catécholamines (communication personnelle du Dr. Emmanuel Deval). Nous avons donc prélevé le liquide céphalorachidien au niveau d'un ventricule latéral des souris après qu'elles aient été

injectées dans le 3^{ème} ventricule avec PcTx1 pour évaluer le relargage d'enképhaline induit par PcTx1. Le taux de Leu-enképhaline ne varie pas tandis qu'il y a une élévation très importante (X 4-5) du taux de Met-enképhaline après injection de PcTx1. Nous avons observé la même induction chez des souris traitées avec l'oligonucléotide antisens d'ASIC1a. Le taux de Met-enképhaline n'est pas aussi élevé qu'après injection de PcTx1 mais il faut préciser que le prélèvement de LCR a été réalisé après 3 jours de traitement par oligonucléotide antisens et non après la première journée d'injection.

Nous avons tenté de localiser les sites d'action de PcTx1 aux niveaux spinal et cérébral. Les stratégies mises en œuvre, utilisant la PcTx1 iodée (après adjonction d'un résidu tyrosine permettant la iodation) injectée intracérébroventriculairement et induisant une analgésie, ou encore la biotinylation à PcTx1, se sont révélées inefficaces pour localiser le peptide au niveau de coupes histologiques. De même, l'injection d'antisens marqués par la fluorescéine n'a pas apporté d'information utile. Nous avons dû nous contenter d'une localisation des ARNm d'ASIC1a révélée par hybridation *in situ* avec colocalisation immunohistochimique de la Met-enképhaline. Les résultats obtenus mettent en évidence une colocalisation des marquages au niveau des différentes laminae de la corne dorsale. Une localisation plus précise pourrait permettre de déterminer si les canaux ASIC1a et les vésicules contenant la Met-enképhaline sont situées sur les mêmes terminaisons nerveuses ou si les terminaisons neuronales qui contiennent les canaux ASIC1a sont localisées sur un interneurone qui inhiberait le neurone Met-enképhalinergique. Bien entendu, on peut encore spéculer sur d'autres mécanismes.

Les différents modèles de douleur utilisés permettent d'affirmer que l'analgésie provoquée par PcTx1 permet de masquer les douleurs inflammatoires et thermiques aussi efficacement que la morphine. Concernant les douleurs neuropathiques, l'effet de PcTx1 est significatif mais moins important que celui de la morphine. Cela peut suggérer que les mécanismes enképhalinergiques de modulation de la douleur sont déjà activés lors de douleurs neuropathiques, par conséquent, l'effet de l'inhibition d'ASIC1a par PcTx1 sur ce système déjà activé n'est que modéré. Il peut également s'agir d'une diminution de l'expression d'ASIC1a dans ce type de douleur chronique, mais cela reste à vérifier. Pour ce qui est du

modèle d'inflammation que nous avons utilisé, l'injection intraplantaire de formol, il est intéressant de noter que dans la phase purement inflammatoire de ce modèle, l'effet de PcTx1 est supérieur à celui de la morphine. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'expression d'ASIC1a augmente lors de l'inflammation au niveau des neurones homolatéraux de la corne dorsale de la moelle épinière (Wu et al. 2004; Duan et al. 2007). Un autre modèle de douleur inflammatoire, l'injection d'adjuvant de Freund intraplantaire chez le Rat, a été utilisé par Duan et collaborateurs pour montrer que le blocage d'ASIC1a à la fois par l'amiloride et le venin de *Psalmopeus cambredgei* qui contient PcTx1 a un effet analgésique. De plus, ces mêmes auteurs montrent que lors de l'inflammation, l'augmentation de l'expression d'ASIC1a par les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière est responsable de l'hypersensibilité induite par l'inflammation. Cette augmentation d'expression d'ASIC1a s'observe dans les mêmes conditions au niveau des neurones du ganglion spinal. De plus au niveau spinal, lors de l'inflammation, le venin de *Psalmopeus cambridgei* abolit les décharges toniques et par conséquent inhibe la transmission du signal nociceptif. Ainsi l'inhibition périphérique d'ASIC1a contribue également à la diminution de la douleur inflammatoire par des mécanismes différents de ceux que nous avons mis évidence.

À l'évidence, la Met-enképhaline induit le même type de tolérance que la morphine en activant les récepteurs μ . Il semble qu'indépendamment de ses effecteurs, l'activation du récepteur μ soit responsable de l'induction d'une tolérance. En effet, la tolérance aux opiacés qui apparaît lors de l'utilisation répétée d'opiacés est due à une désensibilisation des récepteurs μ qui sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ce processus de désensibilisation implique une phosphorylation des récepteurs qui permet une liaison à des protéines régulatrices, les β -arrestines, puis une internalisation de ces complexes. Les souris invalidées pour le gène codant la β -arrestine-2 ne présentent plus de tolérance à la morphine (Bohn et al. 2000). L'absence de tolérance à la morphine chez ces souris n'implique pas l'absence de dépendance. Ce qui montre bien que les deux mécanismes sont indépendants l'un de l'autre. La dépendance aux effets de PcTx1 injectée dans le liquide cébrospinal n'a pas encore été testée et mériterait d'être étudiée.

Enfin, l'induction de troubles moteurs chez la Souris par la morphine est bien établie, il semble que ces effets s'apparentent à une ataxie morphino-induite. Les peptides opioïdes endogènes ne semblent pas induire ce type d'effet indésirable chez les rongeurs (Fichna et al. 2007a).

A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms

Michel Mazzuca^{1,4}, Catherine Heurteaux^{1,4}, Abdelkrim Alloui^{2,4}, Sylvie Diochot¹, Anne Baron¹, Nicolas Voilley¹, Nicolas Blondeau¹, Pierre Escoubas¹, Agnès Gélout², Anny Cupo¹, Andreas Zimmer³, Anne M Zimmer³, Alain Eschalier² & Michel Lazdunski¹

Psalmotoxin 1, a peptide extracted from the South American tarantula *Psalmopoeus cambridgei*, has very potent analgesic properties against thermal, mechanical, chemical, inflammatory and neuropathic pain in rodents. It exerts its action by blocking acid-sensing ion channel 1a, and this blockade results in an activation of the endogenous enkephalin pathway. The analgesic properties of the peptide are suppressed by antagonists of the μ and δ -opioid receptors and are lost in *Penk1*^{-/-} mice.

Improving the treatment and the prevention of acute and chronic pain is an important goal for modern medicine. Ion channels have recently become very attractive targets in the search of new analgesics¹.

Acid-sensing ion channels (ASICs) are expressed throughout the central and peripheral nervous systems^{1–5}. ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b and ASIC3 are abundantly expressed in small DRG neurons, where ASIC3 is predominantly implicated in a variety of pain sensations^{6–8}. ASIC1a, ASIC2a and ASIC2b are abundant in brain and spinal cord neurons^{2–8}. The most potent pharmacological agent for ASIC channels is psalmotoxin 1 (PcTx1). This peptide, which was isolated from a tarantula venom⁹, potently and specifically inhibits homomeric ASIC1a channels. PcTx1 is not lethal, even at high concentrations, and could be a candidate for therapeutic applications. PcTx1 blocks ASIC1a channels in brain neurons⁹, as well as in nociceptors¹⁰. It also blocks ASIC1a channels in spinal neurons (see **Supplementary Results** and **Supplementary Fig. 1** online), which permits the use of intrathecal injections.

We first evaluated the effects of PcTx1 on behavioral reactions in acute pain models (see **Supplementary Methods** online). In tail immersion and hot plate tests, a large antinociceptive effect was observed following both intrathecal and intracerebroventricular (ICV) injections of PcTx1 (**Fig. 1**). Intraperitoneal or subcutaneous injections had no effect, which was expected, as PcTx1 is a peptide. Morphine induced an antinociceptive effect very similar to that of PcTx1 (**Fig. 1a,b,d**). A similar antinociceptive effect was also produced by intrathecal injection of specific antisense nucleotides (**Fig. 1c**) that have previously been used successfully¹¹ to eliminate ASIC1a expression in the retina. We used a formalin test to investigate the PcTx1 effects (intrathecal) in

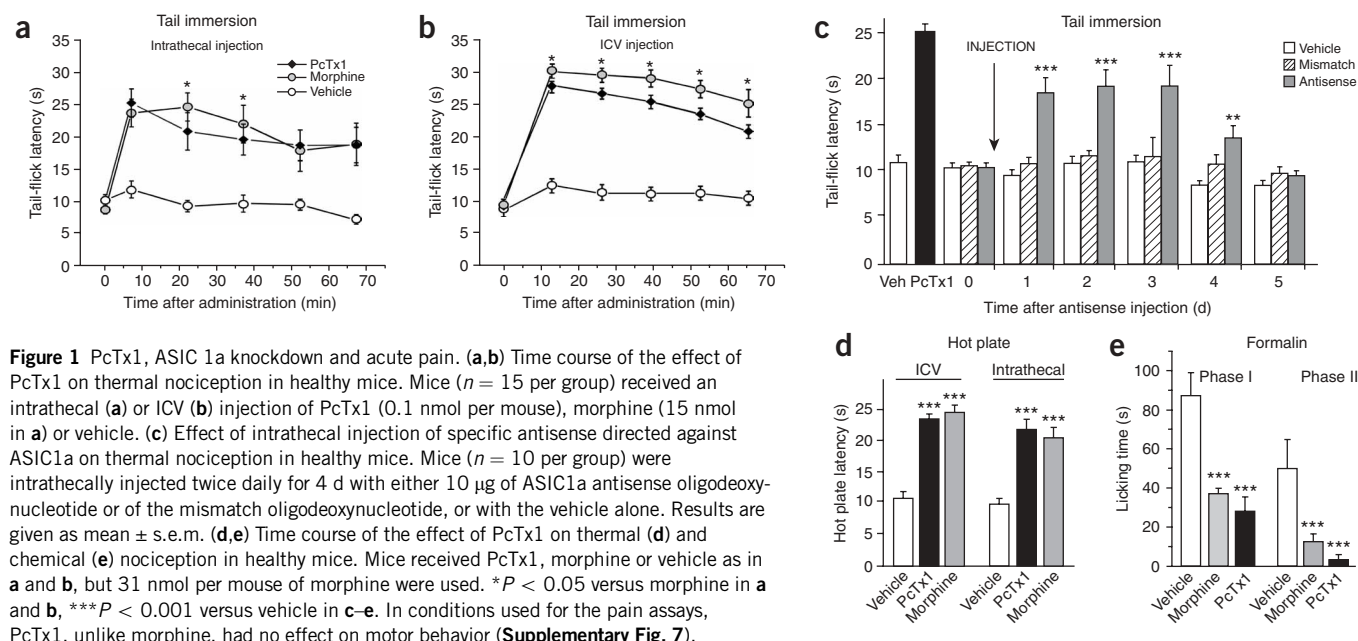
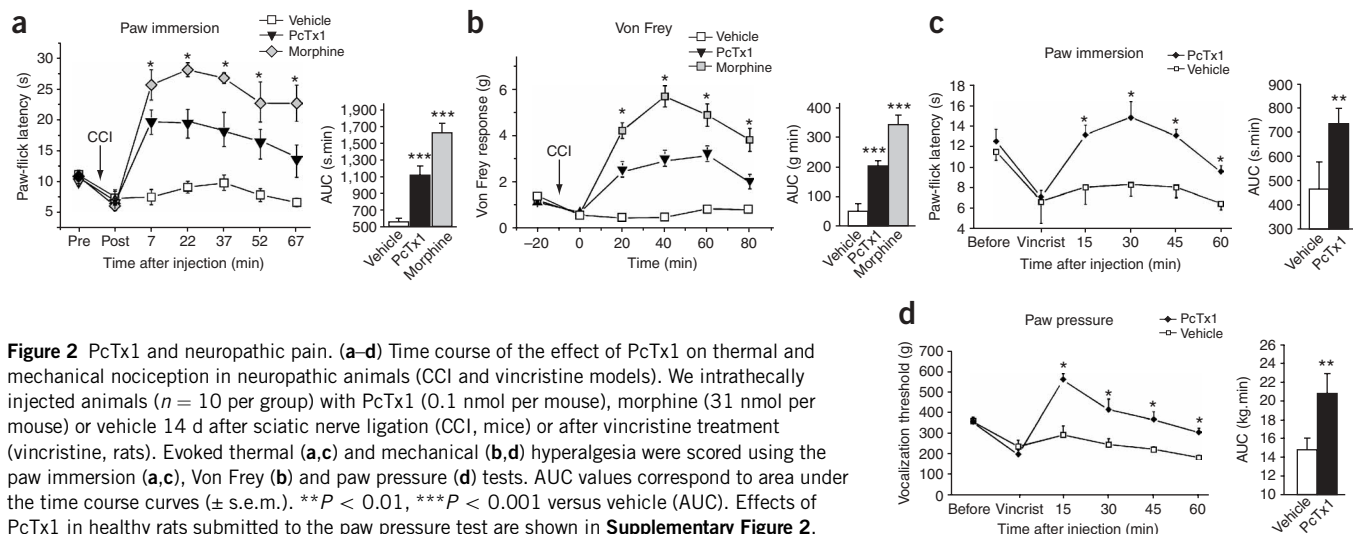


Figure 1 PcTx1, ASIC 1a knockdown and acute pain. **(a,b)** Time course of the effect of PcTx1 on thermal nociception in healthy mice. Mice ($n = 15$ per group) received an intrathecal **(a)** or ICV **(b)** injection of PcTx1 (0.1 nmol per mouse), morphine (15 nmol in **a**) or vehicle. **(c)** Effect of intrathecal injection of specific antisense directed against ASIC1a on thermal nociception in healthy mice. Mice ($n = 10$ per group) were intrathecally injected twice daily for 4 d with either 10 μ g of ASIC1a antisense oligodeoxynucleotide or of the mismatch oligodeoxynucleotide, or with the vehicle alone. Results are given as mean \pm s.e.m. **(d,e)** Time course of the effect of PcTx1 on thermal **(d)** and chemical **(e)** nociception in healthy mice. Mice received PcTx1, morphine or vehicle as in **a** and **b**, but 31 nmol per mouse of morphine were used. * $P < 0.05$ versus morphine in **a** and **b**, *** $P < 0.001$ versus vehicle in **c–e**. In conditions used for the pain assays, PcTx1, unlike morphine, had no effect on motor behavior (**Supplementary Fig. 7**).

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Paul Hamel, Université de Nice-Sophia-Antipolis, 660 Route des Lucioles 06560 Valbonne, France. ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 766, Faculté de Médecine, CHU, Clermont-Ferrand, France. ³University of Bonn, Department of Molecular Psychiatry, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.L. (ipmc@ipmc.cnrs.fr).

Received 4 June; accepted 22 June; published online 15 July 2007; doi:10.1038/nn1940



irritant chemical nociception (acute, phase I) and in inflammation (late, phase II) (**Fig. 1e**). In phase I (0 to 5 min), morphine and PcTx1 had comparable antinociceptive effects. In phase II (from 30 to 40 min), the score reduction induced by PcTx1 was even higher than that induced by morphine ($P < 0.05$). These three acute pain models are indicative of a potent antinociceptive effect of PcTx1.

We then analyzed the effects of PcTx1 in two persistent pain models (see **Supplementary Methods**). Mononeuropathy caused by a chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve in rat produced a hyperalgesic

state and tactile allodynia (**Fig. 2a,b**). Similar to morphine, PcTx1 reversed both the thermal hyperalgesia and the tactile allodynia. On healthy rats, PcTx1 only slightly increased the mechanical threshold (**Supplementary Fig. 2** online). We also assessed PcTx1 action using a mouse vincristine-induced neuropathy model (see **Supplementary Methods**). Vincristine is an anticancer drug that is unfortunately associated with peripheral neuropathy. Vincristine induced hypersensitivity to heat (**Fig. 2c**) and to mechanical stimuli (**Fig. 2d**), which was completely abolished by PcTx1 (**Fig. 2c,d**).

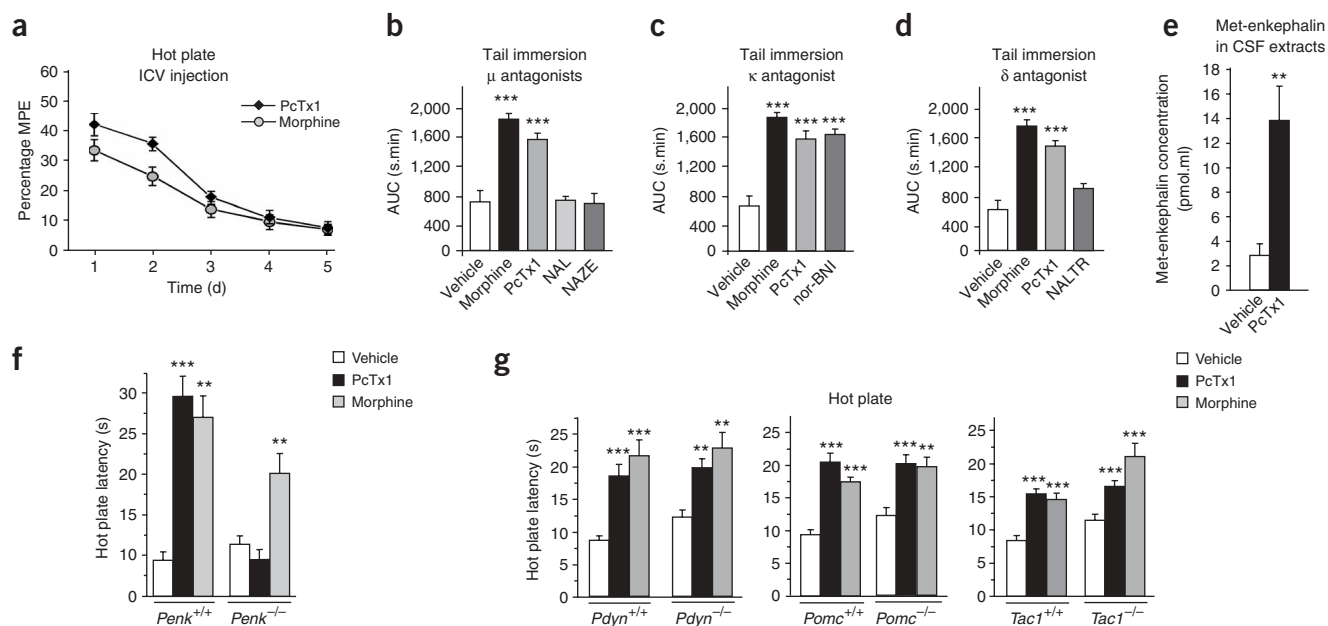


Figure 3 Opioid receptors and enkephalins are involved in the antinociceptive effect of PcTx1. (a) Repeated ICV injections of PcTx1 or morphine into healthy mice results in tolerance ($n = 10$ per group). MPE, maximum possible effect. (b–d) Effects of pretreatment with μ (b), κ (c) and δ opioid (d) antagonists on tail immersion responses produced by ICV administration of PcTx1 (0.1 nmol, $n = 12$ per group). NAL, naloxone; NAZE, naloxonazine; NALTR, naltrindole; injected before PcTx1. Morphine (15 nmol per mouse, ICV), PcTx1 (0.1 nmol per mouse, ICV) and vehicle (ICV) were injected alone as controls. $^{***}P < 0.001$ versus vehicle. (e) Effect of PcTx1 (0.1 nmol per mouse, ICV) on met-enkephalin concentration (pmol per ml) in cerebrospinal fluid (CSF). (f,g) Comparison of nociceptive behavior of wild-type, *Penk1*^{−/−} (f), *Pdyn*^{−/−}, *Pomc*^{−/−} and substance P (*Tac1*^{−/−}) (g) mice to noxious thermal stimulus (52 °C). Mice ($n = 10$ per group) received an intrathecal injection of PcTx1 (0.1 nmol per mouse), morphine (31 nmol per mouse) or vehicle. Results are given as mean \pm s.e.m. $^{***}P < 0.001$, $^{**}P < 0.01$ versus vehicle. NAL, NAZE, nor-BNI and NALTR were without effect by themselves (**Supplementary Fig. 4**).

Because there is no additivity between the analgesic effects of morphine and PcTx1 (**Supplementary Fig. 3** online) and because PcTx1 treatment, similar to morphine treatment, results in tolerance (**Fig. 3a**), we asked whether the analgesic ICV effect of PcTx1 was inhibited by naloxone, a nonspecific antagonist of the opioid receptors, by naloxonazine, a specific antagonist of μ 1-opioid receptors, by naltrindole, a δ -receptor antagonist, and by nor-binaltorphimine (nor-BNI), a κ -opioid receptor antagonist, both without any effect by themselves (**Supplementary Fig. 4** online). The inhibitory effects of naloxone, naloxonazine and naltrindole indicated that PcTx1 produces its antinociceptive effect via the stimulation of μ - and δ -opioid receptors (**Fig. 3b–d**). ASIC1a was coexpressed with Met-enkephalin in the dorsal horn neurons (**Supplementary Fig. 5** online). Enkephalins, endogenous opioid peptides, are potent ligands of both μ and δ receptors¹², and are involved in the analgesic effect of PcTx1. ICV injection of PcTx1 (like injection of ASIC1a antisense nucleotides, **Supplementary Fig. 6** online) increased Met-enkephalin levels in the cerebrospinal fluid (**Fig. 3e**), and the analgesic effect of PcTx1 was lost in mice deficient for the *preproenkephalin* gene (*Penk1*^{−/−} mice) (**Fig. 3f**), but not in mice lacking either the *pro-opiomelanocortin- α* (*Pomc*^{−/−}) or *prodynorphin* (*Pdyn*^{−/−}) genes, or in mice deficient for *tachykinin* (*Tac1*^{−/−}) (**Fig. 3g**).

These results suggest that the ASIC1a channel is an important molecular target for treating both acute and neuropathic pain and that PcTx1 itself could be a new specific analgesic drug working upstream of the opiate receptors. Being a peptide, PcTx1 would have to be injected intrathecally to patients, similarly to ω -conotoxin MVIIA, a peptide originating from cone snail venom, which blocks high-voltage activated Ca²⁺ channels and has been approved for use in human patients¹³. Knowing that PcTx1 has analgesic effect and that it does not show some of the secondary effects of morphine (**Supplementary Fig. 7** online) will also encourage the search for nonpeptidic blockers of the ASIC1a channel, which can be taken orally. Our work also highlights the connection between ASIC1a and the endogenous opioid system (**Fig. 3**). ASIC1a blockade leads to the activation of the enkephalin system, but the mechanistic details by which this happens are not yet known. Notably, ASIC1a is also modulated by peptides of the FMRF family^{5,8,14}, which are abundant in brain and spinal cord and have anti opioid properties¹⁵, and is inhibited by PcTx1, which displays opioid-like properties against pain. It is thus tempting to correlate these observations and to suggest that ASIC1 channels are at a crossroad between the enkephalin and the FMRF-related peptides pathways. It is also tempting to suggest that FMRF-like peptides negatively control the antinociceptive opiate

pathway through the ASIC1a channel. This negative control would then disappear when ASIC1a is blocked by PcTx1. Hopefully, this may open a new avenue of research into the endogenous opioid mechanisms in nociception.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to M. Jodar and Y. Benhamou for expert technical assistance and to A. Patel for the reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, the Agence Nationale de la Recherche (Projet Analgésie et canaux Ioniques dans les voies Nociceptives), the Paul Hamel Institute and the Association Française contre les Myopathies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.M. and C.H. did the initial observations and conducted a large part of the experiments, analyzed the data and participated to the preparation of the manuscript. A.A., S.D., A.G. and A.E. conducted pain experiments both with PcTx1 and the antisense strategy. A.B. conducted localization and electrophysiological experiments and helped in the preparation of the manuscript. P.E. produced and provided PcTx1. N.V. was responsible for the localization and colocalization experiments. N.B. was associated with experiments using opiate antagonists. A.C. measured met-enkephalin concentrations in the cerebrospinal fluid. A.Z. and A.M.Z. provided the *Enk*^{−/−}, *Dyn*^{−/−} and *Tac1*^{−/−} mice. M.L. supervised the project and wrote the manuscript.

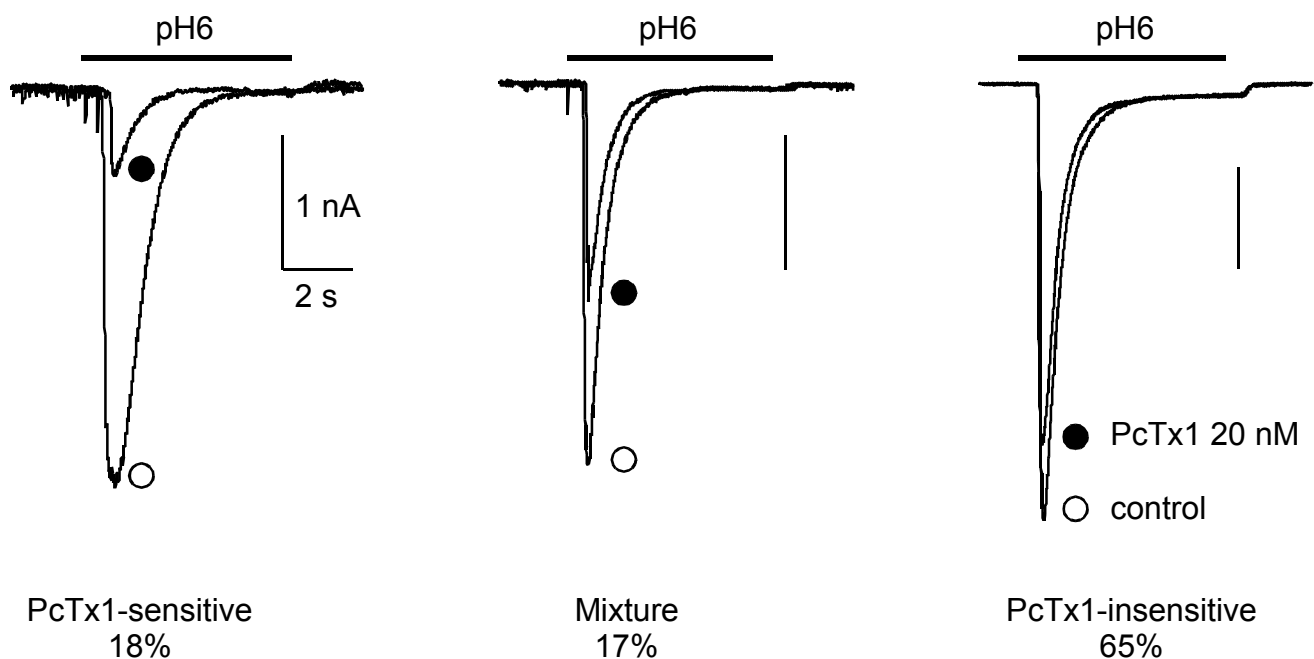
COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

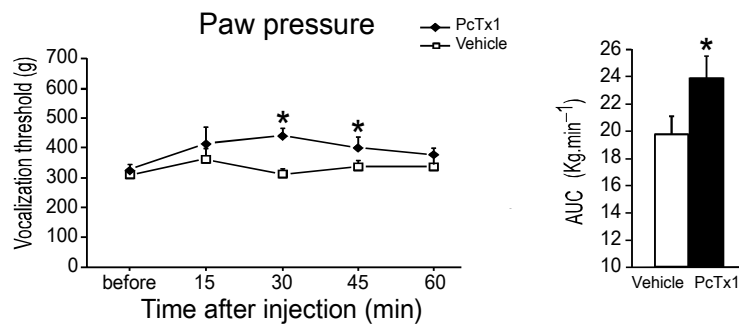
Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

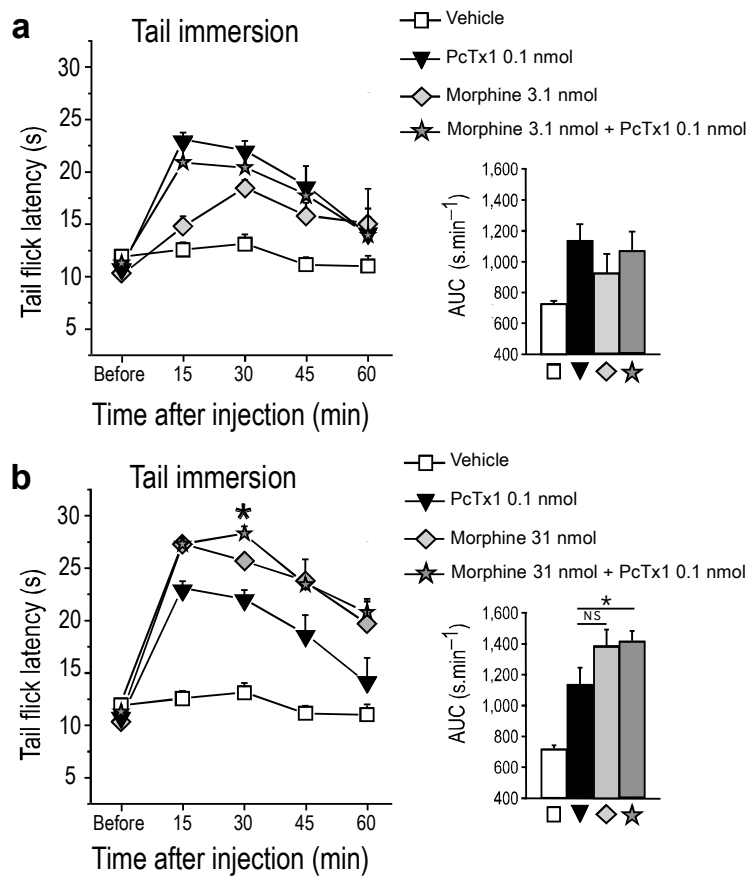
1. Wood, J.N. *Handb. Exp. Pharmacol.* **177**, 329–358 (2007).
2. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. *Nature* **386**, 173–177 (1997).
3. Waldmann, R. & Lazdunski, M. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 418–424 (1998).
4. Krishtal, O. *Trends Neurosci.* **26**, 477–483 (2003).
5. Wemmie, J.A., Price, M.P. & Welsh, M.J. *Trends Neurosci.* **29**, 578–586 (2006).
6. Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P. & McCleskey, E.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 711–716 (2001).
7. Sluka, K.A. *et al. Pain* **129**, 102–112 (2007).
8. Lingueglia, E., Deval, E. & Lazdunski, M. *Peptides* **27**, 1138–1152 (2006).
9. Escoubas, P. *et al. J. Biol. Chem.* **275**, 25116–25121 (2000).
10. Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M. & Voilley, N. *J. Neurosci.* **22**, 10662–10670 (2002).
11. Ettaiche, M., Deval, E., Cougnon, M., Lazdunski, M. & Voilley, N. *J. Neurosci.* **26**, 5800–5809 (2006).
12. Kieffer, B.L. & Gaveriaux-Ruff, C. *Prog. Neurobiol.* **66**, 285–306 (2002).
13. Lewis, R.J. & Garcia, M.L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 790–802 (2003).
14. Wemmie, J.A. *et al. Neuron* **34**, 463–477 (2002).
15. Roumy, M. & Zajac, J. *Eur. J. Pharmacol.* **345**, 1–11 (1998).



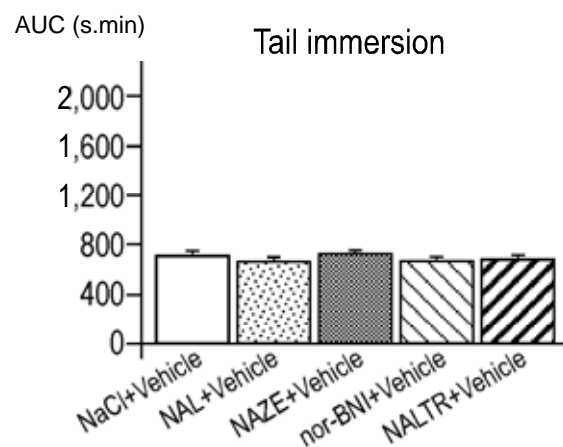
SUPPL FIGURE 1: Effect of PcTx1 on ASIC currents recorded from mouse dorsal spinal neurons. Original currents recorded from three typical neurons showing the effect of PcTx1 at a dose that fully inhibits heterologously expressed homomeric ASIC1a current¹⁵: from left to right, a PcTx1-inhibited current, a mixed half-inhibited and a PcTx1-resistant current. For each neuron, a control current (I) and a current in the presence of 20 nM PcTx1 (λ) are shown. Currents were recorded at -50 mV and activated by a pH drop from 7.4 to 6 every minute.



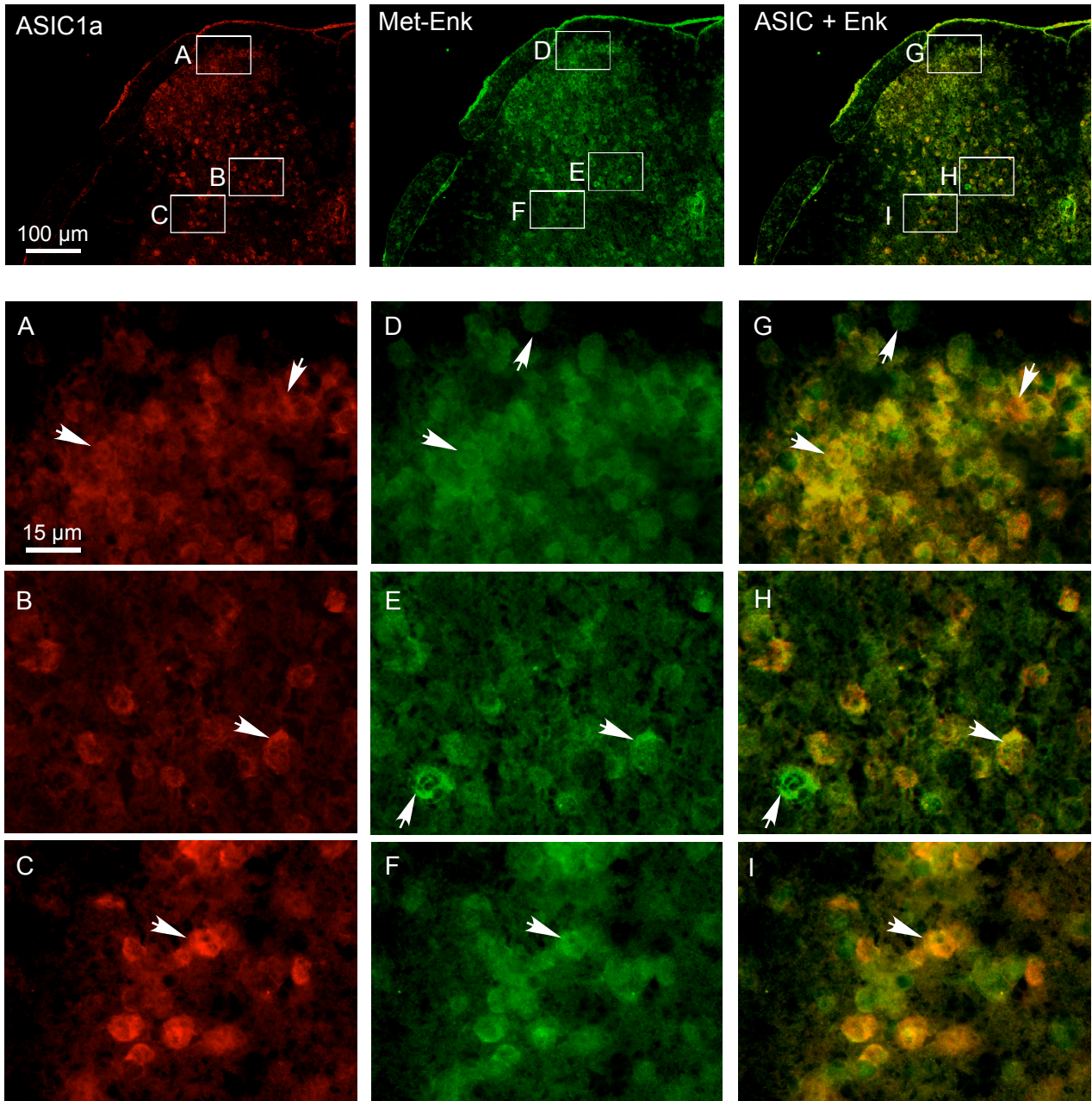
SUPPL FIGURE 2: PcTx1 and paw pressure in healthy rats. Time course of the effects of PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle (10 μ l) on mechanical nociception. Evoked mechanical nociception was scored using the Paw pressure test. AUC \pm sem values correspond to area under the time course curves. * P <0.05 vs vehicle.



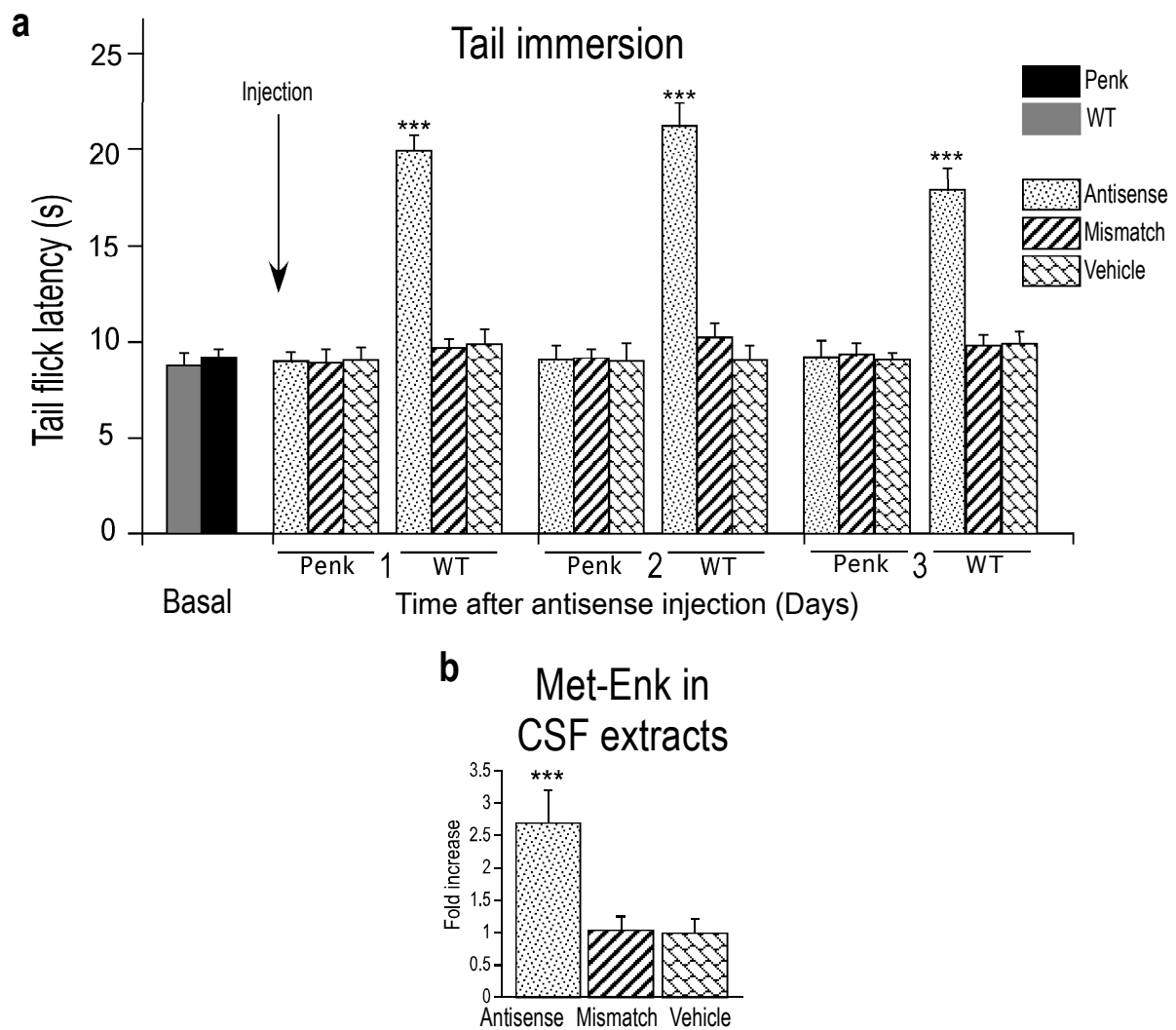
SUPPL FIGURE 3: Analgesic effects of combinations of morphine and PcTx1. (a, b) Effects of different concentrations of morphine and/or PcTx1 i.t. injection on tail immersion responses (n=10 per group). Mean \pm sem are shown. P <0.005, Morphine and PcTx1 vs PcTx1; two-way analysis of variance (ANOVA).



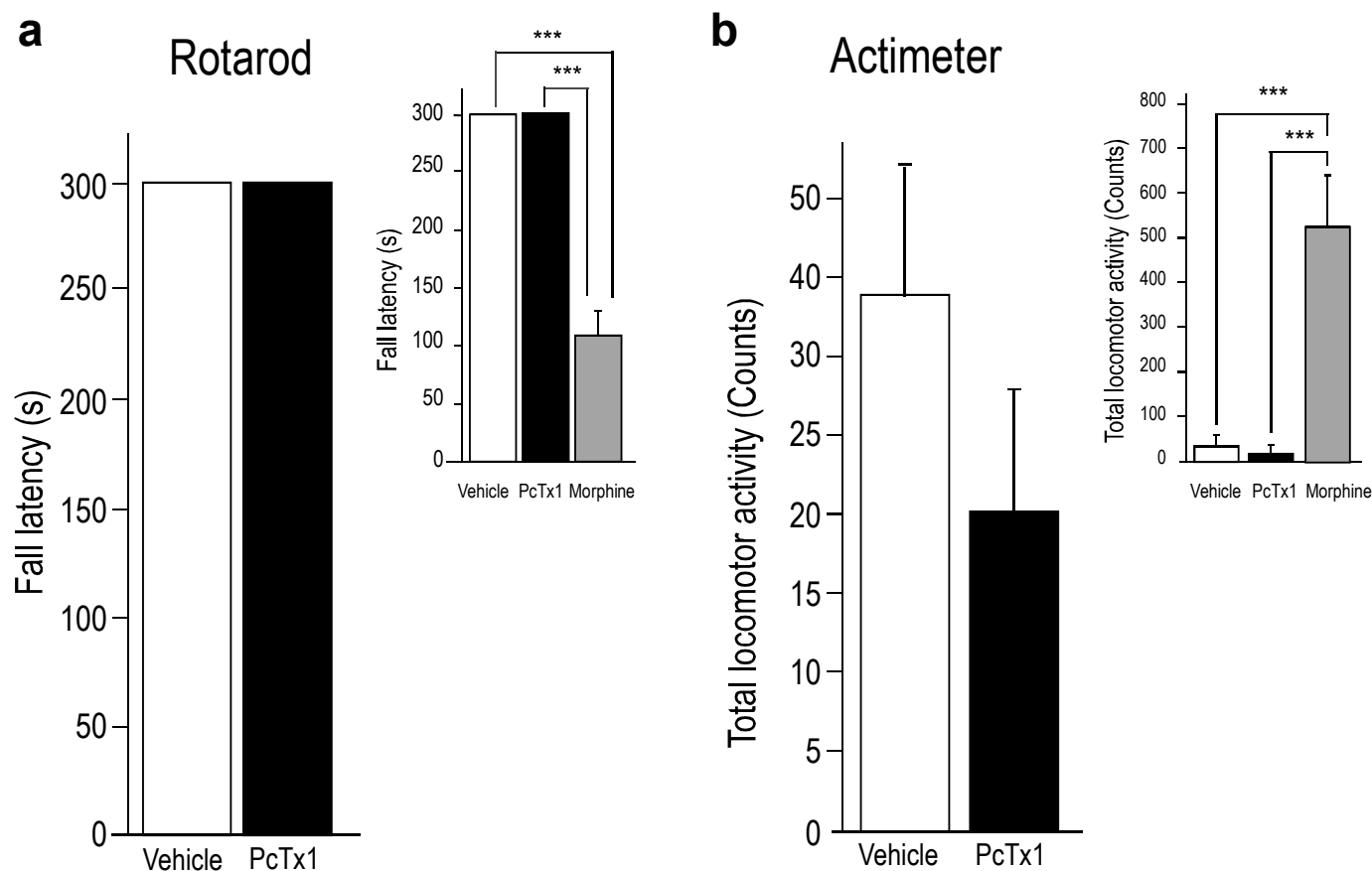
SUPPL FIGURE 4: Effects of treatment with μ , κ and δ opioid antagonists alone on tail immersion responses (n=10 per group). NAL = naloxone, NAZE = naloxonazine, nor-BNI = norbinaltorphimine, NALTR = naltrindole. AUC \pm sem values correspond to area under the time course curves.



SUPPL FIGURE 5: ASIC1a and Met-Enkephalin expressions in the dorsal horn of mouse spinal cord. ASIC1a expression detected by *in situ* hybridization (red) is distributed throughout the dorsal horn. Met-Enkephalin detected by immunochemistry (green) is present throughout the gray matter as described in the literature²³. The overlay (right picture) shows a colocalization in the different laminae of the dorsal horn (yellow). Close-up pictures (A-I) reveal that a majority of cells expresses ASIC1a and Met-Enkephalin (horizontal arrows) although some cells express only ASIC1a (pointing-down arrows) or only Met-Enkephalin (pointing-up arrows).



SUPPL FIGURE 6: (a) Effect of i.t. injection of specific antisense directed against the ASIC1a subunit on thermal nociception in wild type mice and Penk1 deficient mice. Six groups of mice were i.t. injected daily during 3 days with 10 μ l of solution containing either 10 μ g of ASIC1a-Antisense, 10 μ g of the mismatch ODN, or the vehicle alone. Mice (n=10 per group) were tested for nociceptive responses to a noxious thermal stimulus (Tail immersion test) at different times after antisense injection. The response scale was measured in seconds (sec) for the latency of tail withdrawal from the water bath. Results are given as mean \pm sem. *** P <0.001 vs vehicle. **(b) Effect of specific antisense directed against the ASIC1a subunit, and mismatch, (20 μ g/day/mouse/3 days, i.t.) on Met-Enkephalin concentration in CSF.** Fold-increase in Met-enkephalin CSF extracts are normalized to vehicle value. Mean \pm sem *** P <0.001 vs vehicle.



SUPPL FIGURE 7: Effects of i.c.v. injections of PcTx1 or morphine on locomotor behaviour in healthy mice. (a) Accelerating Rotarod. Accelerating rotarod trained mice (n=10 per group) were i.c.v. injected with PcTx1 (0.1 nmole) or morphine (31 nmoles) or vehicle (10 μ L). Latency to fall was measured 10 minutes after injection. Data were expressed as average latency to fall \pm sem *** P <0.001 vs morphine. **(b) Spontaneous activity monitoring.** Spontaneous locomotor activity of mice (n=10 per group) (Ten minutes after injection, the spontaneous locomotor activity was monitored for 60 min. The compounds, morphine (31 nmoles) PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle (10 μ L) were administered i.c.v. and locomotor activity was monitored for 180 min. Data were expressed as the number of light beams broken (counts) during the 60 min test period (mean total locomotor activity \pm sem) *** P <0.001 vs morphine.

SUPPLEMENTARY METHODS

Assessment of nociceptive reactions

Tail or paw immersion test. The mouse tail or the right hind paw of mononeuropathic mouse was immersed in a water bath at noxious temperature (46°C) until tail or paw withdrawal was observed (cut-off time 30 sec)¹. The latency time for the animal to remove its tail or its paw from the bath was recorded as “pain” parameter. The latency times (sec) were determined at 7, 22, 37, 52 and 67 min after vehicle, PcTx1 or morphine injection.

Hot plate test. Mice remained on an aluminium plate heated to 52°C until they started licking their forepaws. The thresholds were determined from three consecutive measurements (cut-off time 30 sec) 7 min after injection (vehicle, PcTx1 or morphine).

Formalin test. This test² evaluates behavioural responses to the subcutaneous injection of 15 μ l of 5% formalin into the plantar surface of the right hindpaw. The total time spent in licking and biting the right hindpaw over the next 60 min was determined and used as “pain” parameter.

Paw pressure test. Using an analgesimeter, the antihyperalgesic effect of PcTx1 or morphine was assessed by applying increasing pressure (maximal pressure: 750g) to the right hindpaw of unrestrained rats until a squeak (vocalization threshold) was obtained³. The thresholds (in grams) were then determined at 15, 30, 45, and 60 min after injection.

Von Frey test. The tactile allodynia was assessed by using calibrated von Frey filaments (0.0045-5.4950 g). The filaments, tested in order of increasing stiffness, were applied 5 times perpendicularly to the plantar surface of hindpaw and pressed slowly until they bent. The first filament which evoked at least one response was assigned as the threshold⁴.

Neuropathic pain models

Induction of a mononeuropathy by chronic constriction injury of sciatic nerve (CCI model).

A unilateral peripheral mononeuropathy was induced, as previously described⁵. Three chromic gut (5-0) ligatures were tied loosely (with about 1 mm spacing) around the common sciatic nerve of anesthetized mice. The nerve was constricted to a barely perceptible degree, so that circulation through the epineural vasculature was not interrupted. The assessment of mechanical and heat sensitivity was performed on the sciatic nerve ligated paw at day 0 (before surgery) and day 14 (after surgery).

Induction of a neuropathy by vincristine. Vincristine was administered intravenously, in rats, every 2-days until five injections were given⁶. The assessment of mechanical and thermal sensitivity was performed at day 0 (before induction) and day 14 after induction of the trouble, using the paw pressure and the paw immersion tests, respectively.

Statistical analysis

Results are expressed in seconds (sec) or in grams (g) as mean \pm s.e.m. for latency times and reaction thresholds, respectively. Areas under the time course curves (AUC) of variations (post-drug-pre-drug values) of latency times or reaction thresholds were calculated from normalized individual scores at each time using the trapezoidal method.

Data were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed, when the *F* value was significant, by a Fischer *t*-test, when the time-course of the effect was compared. A one-way ANOVA followed by a Student *t*-test was used to compare the effect of different treatments as determined by AUC. The level of statistical significance (*) was set at $P < 0.05$.

Animals. All experiments were performed on 20-24g C57BL/6J male mice and Sprague-Dawley male rats (250-300 g) housed in grouped cages in a temperature- and hygrometry-controlled environment with food and water *ad libidum*. All animals were acclimatized to the laboratory conditions for at least one week before testing. Each behavioural experiment was performed blindly, in a quiet room by the same experimenter. All procedures were conducted according to policies on the care and use of laboratory animals of the Society of Neurosciences, and also with respect to national laws on animal use. Mice deficient in pre-proenkephalin gene (*Penk1*^{-/-})⁷, β -endorphin gene (*POMC*^{-/-})⁸ or prodynorphin gene (*Pdyn*^{-/-})⁹, or tachykinin 1 gene (*Tac1*^{-/-})¹⁰ were generated as previously described⁷⁻¹⁰.

Chemicals and drugs injections. Recombinant PcTx1 was produced as previously described¹¹. BSA (1mg/ml) was added in final dilutions to prevent non specific adsorption of the toxin. Morphine-HCl was purchased from Federa, naloxone-HCl, naloxonazine, nor-BNI and naltrindole were purchased from Sigma-Aldrich. Drugs were dissolved on the day of experimentation in physiological saline solution (mM: NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, HEPES 10 pH 7.35) in a final volume of 10 μ l. [¹²⁵I]Met-enkephalin was prepared as described previously¹².

The intracerebroventricular injections (i.c.v.) were performed on mice deeply anesthetized by inhalation of 2% isoflurane mixed with 30% oxygen and 70% nitrous oxide. PcTx1 and morphine (10 l) were infused at a rate of 0.5 l/min using a 10- 1 Hamilton syringe with a 30 Gauge- needle, which was stereotactically implanted into the fourth ventricle (dorsoventral, -4mm below the cortical surface; mediolateral, +/-0.2mm from bregma and anteroposterior, -6mm from bregma). The intrathecal (i.t.) injections were performed freehand (under light isoflurane anesthesia) between spinal L5 and L6 segments according to the method of Hylden and Wilcox¹³ and Mestre¹⁴ for mice ad rats, respectively.

Culture and patch-clamp recordings of mouse dorsal cord neurons. Dorsal half of spinal cords, collected after a dorsal incision of E14 embryos were dissected in ice-cold medium (HBSS + Glc 6g/l + HEPES 10 mM, pH 7.4). Two enzymatic incubations with 0.1% Trypsine (Seromed) and 217 U/ml Desoxyribonuclease 1 (type IV, Sigma-Aldrich), were performed at 37 °C for 10 minutes each, followed by mechanical triturations in basal culture medium: Neurobasal (Invitrogen) + Glutamax 1% (Invitrogen) + Gentamycine 15 µg/ml (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (ICN), 10% horse serum (Sigma-Aldrich) and 217 U/ml Desoxyribonuclease 1. After centrifugation, neurons were plated at a density of 150 000 cells in 35 mm poly-L-lysine -coated tissue culture plates, in basal culture medium with 2% B27 supplement (Invitrogen), 5 µM Uridine and 5 µM 5-Fluoro-2' deoxyuridine (Sigma-Aldrich), and kept in 95% air/5% CO₂ at 37°C. Cells were used for electrophysiological recordings up to three weeks after plating.

Ion currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique. Data were sampled at 500 Hz or 1 kHz and low-pass filtered at 3 kHz using pClamp8 software (Axon Instruments, USA). The statistical significance of differences between sets of data was estimated by the single-sided Student test. The pipette solution contained (in mM): KCl 140, NaCl 5, MgCl₂ 2, EGTA 5, K₂ATP 2, HEPES 10 (pH 7.35), and the bath solution contained (in mM): NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, glucose 10 mM, HEPES 10 (pH 7.45). CNQX 20 µM, kynurenic acid 10 µM and bicuculline 10 µM (all from Sigma-Aldrich) were added in order to inhibit glutamate- and GABA-induced currents. MES was used instead of HEPES to buffer bath solution pH ranging from 6 to 5. Changes in extracellular pH were induced by shifting one out of six outlets of a microperfusion system. Experiments were carried out at room temperature (20-24 °C). 0.1% bovine serum albumin was added in extracellular solutions containing PcTx1¹⁵ to prevent its adsorption to tubing and containers. PcTx1 was applied before and between pH drops and the steady-state inhibition was measured after 3 min.

Oligodeoxynucleotides targeting the ASIC1a subunit. An ASIC1a antisense oligonucleotide was used to induce a knock-down of the ASIC1a mRNAs as previously described¹⁶. The oligonucleotide was selected from a specific site of the rat ASIC1a mRNA (accession number [U94403](#)). The 16-mer AS was designed to encompass the translation initiation site (5'-CA-ATT-CCA-TCC-TTG-CC-3'). We administered wild type mice or Penk1^{-/-} mice intrathecally either vehicle or antisense, twice a day (20 µg/day/mouse) or mismatch (20 µg/day/mouse) for 4 days. The withdrawal thresholds, using the tail immersion test, were then measured at day 1, 2, 3, 4 and 5 post-injection.

Administration of opioid receptors antagonists¹⁷. PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle was i.c.v. injected after subcutaneous (s.c.) injection of different opioid antagonists: non-selective opioid-receptor antagonist naloxone (2 mg/kg, injected 10 min before PcTx1), κ -opioid receptor antagonist norbinaltorphimine (nor-BNI; 10 mg/kg, injected 60 min before PcTx1), δ -opioid receptor antagonist naltrindole (20 mg/kg, injected 30 min before PcTx1) and selective μ -opioid receptor antagonist naloxonazine (35 mg/kg, injected 24h before PcTx1). The withdrawal thresholds, using the tail immersion test, were then measured at 7, 22, 37, 52 and 67 min after injection.

Radioimmunoassay of Met-Enkephalin. Cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected in mice injected with either saline, PcTx1 (0.1 nmole i.c.v.) or after 3 consecutive days of daily injections of antisense, mismatch or vehicle to determine the efflux of neuropeptides. CSF collecting was performed under stereotaxic conditions in the lateral ventricle of anaesthetized mice (dorsoventral -0.5mm below the cortical surface, mediolateral +1.6mm and anteroposterior -2.4mm from bregma) with a micrometric syringe. The enkephalin quantitation in CSF was performed using the Met-enkephalin antiserum, which has a very low cross-reactivity with Leu-enkephalin (2%) and other opioid peptides (<0.1%)¹². All reagents were diluted in the RIA buffer (10 mM disodium phosphate, 150 mM NaCl, 1 gm/l BSA, and 0.1 gm/l NaN₃, pH 7.2). Fifty microliters of the antibody dilution (diluted to 1:75,000), 50 μ l of the [¹²⁵I]Met-enkephalin (45000 cpm/ml), 60 μ l of the standard Met-enkephalin, or dialysates were used. After 44 hr of incubation at 4°C, the assay was stopped by adding 500 μ l of dextran T70 (4 gm/l) and charcoal (40 gm/l) in the RIA buffer containing 10% filtered horse serum. After centrifugation (4000 rpm, 10 min, 4°C), [¹²⁵I]Met-enkephalin bound to the antibodies was measured in the supernatant by gamma spectrometry using a Wallac counter. Under these conditions, 0.1 pg of enkephalin can be detected in the samples.

Measurement of locomotor activity.

Accelerating rotarod assay. Comparative effects of morphine or PcTx1 on motor behavior were evaluated first on the accelerating rotarod (Rustay et al. 2003). The apparatus was an accelerating Rota-rod treadmill for mice (7650 Ugo Basile®). The mouse was placed onto the dowel with the rotarod rotating at 4 rpm and the rotarod was accelerated at a constant rate of 5 rpm/min up to 40 rpm. The latency to fall to the floor was automatically recorded, with a maximum cutoff latency of 300 sec.

Each mouse received 10 consecutive training trials separated by a 30-s intertrial interval. Twenty-four hours later, the mice received a baseline acclimation trial followed by two more baseline trials (average=pre-treatment performance). The mice were then i.c.v. treated with

morphine (31 nmoles), PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle (10 µl) and returned to the home cage for 10 min. There was then an acclimation trial followed by two test trials (average=post-treatment performance).

Spontaneous activity monitoring. An actimeter consisting of a bank of 8 individual wire (top, floor and front door) and Plexiglas (side walls) photocell cages was used to measure the spontaneous locomotor activity. Each cage (40x25x23 cm) was fitted with two parallel horizontal infrared beams, 1 cm above the floor, located across the long axis of the cage (Imetronic, Pessac, France). Beam interruptions were accumulated over 1-min intervals and recorded in bins of 1 min by an one-line input to a microcomputer. The animals were familiarized with the experimental cages during an 1-h session, 1 day before the test session. On the day of testing, morphine (31 nmoles), PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle (10 µl) were then i.c.v. administered. Ten minutes after injection, the spontaneous locomotor activity was monitored for 60 min.

Chronic Tolerance. Wild type healthy mice were treated i.c.v. daily during 5 consecutive days with 10 µl of solution containing either 31 nmoles of morphine or 0.1 nmole of PcTx1. Mice (n=10 per group) were tested for nociceptive responses to a noxious thermal stimulus (Hot plate test) 10 min after the last injection. Data are reported as the maximum possible effect (Percentage MPE), which is determined by accounting for each individual basal response time as well as the imposed maximum cut-off time using the following calculation: $100\% \times [(drug \text{ response time} - basal \text{ response time}) / (30 \text{ s} - basal \text{ response time})] = \text{Percentage MPE}$.

Additivity. Wild type mice were i.t. injected with morphine, or PcTx1, or morphine and PcTx1 together, or vehicle (10 µl). Antinociception was assessed on the tail immersion test.

ASIC1a and Met-Enkephalin detection. ASIC1a was detected by in situ hybridization and Met-enkephalin using a specific antibody. Mouse spinal cord frozen 12-µm sections were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Tritonx100, pre-hybridized and hybridized with terminal-transferase biotin-dUTP oligonucleotide sense and antisense probes against ASIC1a. After overnight incubation at 42°C and stringent wash, the sections were blocked with PBS containing 0.1% Tween20, 0.1% BSA and 2% horse serum and incubated overnight at 4°C with specific antibodies against biotin (1:5000 sheep antibody to biotin, Acris Antibodies, Germany) and Met-enkephalin (rabbit serum to Met-enkephalin, 1:5000, (Cupo et al 1985). Detection was done using Alexa Fluor 594 anti-sheep IgG and Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (1:1000, Invitrogen, USA).

SUPPLEMENTARY RESULTS

PcTx1 and neuronal excitability.

The specificity of PcTx1 towards ASIC1a homomers was previously established¹⁵. To completely rule out effects of PcTx1 on other targets than ASIC1a homomers that could also participate in the analgesic effect observed *in vivo*, we investigated the effects of PcTx1 on neuronal excitability parameters and neuronal ionic currents.

The resting potential recorded in current clamp mode was not affected by 10 to 20 nM PcTx1 in primary cultured hippocampal neurons (n = 11, see¹⁸ for methods), sensory DRG neurons (n = 9, see¹⁹ for methods) or dorsal spinal neurons (n = 9). No current was activated by PcTx1 either in sensory DRG neurons (n = 10) or in dorsal spinal neurons (n = 47, holding potential -50 mV). Recorded in the presence of TTX in hippocampal neurons, mini EPSCs were not modified in the presence of PcTx1, in either their amplitude nor their frequency. Action potentials triggered by either EPSCs or ASIC current activation, in hippocampal neurons as well as sensory DRG neurons, were not inhibited by PcTx1. Voltage-dependent Na⁺ currents were recorded in sensory DRG neurons, in which they flow through a mixture of TTX-sensitive and TTX-resistant channels, as well as in hippocampal neurons, in which they flow through TTX-sensitive channels. In both cases, 10 nM PcTx1 had no effect on current amplitudes. Voltage-dependent Ba²⁺ currents were also recorded in sensory DRG neurons as well as in hippocampal neurons, flowing through low-threshold or high threshold Ca²⁺ channels or a mixture of them, depending on the neuron. PcTx1 10 nM had no effect on current amplitudes. For all these experiments, similar results were obtained when currents were recorded either at room temperature or at 30°C.

PcTx1 inhibits ASIC current in dorsal spinal neurons.

ASIC channels are present in dorsal spinal neurons²⁰. The effect of 20 nM PcTx1, a dose that fully inhibits heterologously expressed homomeric ASIC1a current¹⁵, was tested on ASIC currents recorded from such neurons. In response to a pH drop from 7.4 to 6, every recorded dorsal spinal neuron expressed an ASIC current. This current was highly inhibited by PcTx1, down to 19% to 0% of the control current (mean value: 11 ± 2 %, n = 12), in 18% of neurons. These PcTx1-sensitive neurons expressed an ASIC current flowing mainly through homomeric ASIC1a channels (Suppl. Figure 1, left). In the other 17% of neurons, PcTx1 produced an incomplete inhibition of the ASIC current (Suppl. Fig. 1, middle), down to 74% to 20% of the control current (mean value: 47 ± 4 %, n = 16). In these neurons the ASIC current thus appeared to flow through a mixture of PcTx1-sensitive and PcTx1-insensitive channels. In the

remaining 65% of neurons, the ASIC current was poorly inhibited (Suppl. Fig. 1, right), down to a maximum of 75% of the control current (mean value: $92 \pm 2\%$, $n = 19$), thus flowing mainly through PcTx1-insensitive channels.

Stimulatory effects of PcTx1, that could have been related to a potentiation of an ASIC1b current (Chen et al, 2006), were never observed, and quantitative PCR experiments (not shown) indicated that ASIC1b expression was relatively minor compared to ASIC1a expression in the mouse spinal cord (< 30%).

The dorsal spinal cord expresses both homomeric ASIC1a channels and heteromeric ASIC1a-containing channels (probably involving ASIC2a and/or ASIC2b). The proportions of these two channel subtypes expressed in one neuron determines the maximal inhibitory effect of PcTx1. PcTx1-sensitive homomeric ASIC1a channels are expressed in 35% of dorsal spinal neurons.

REFERENCES

1. Janssen, P., Niemegeers, C. & Dony, J. *Arzneimittelforschung* **13**, 502-507 (1963).
2. Murray, C., Porreca, F. & Cowan, A. *J Pharmacol Methods*. **20**, 175-186 (1988).
3. Randall, L. & Selitto, J. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. **111**, 409-419 (1957).
4. Tal, M. & Bennett, G. *Neuroreport*. **5**, 1438-1440 (1994).
5. Bennet, G. & Xie, Y. *Pain* **33**, 87-107 (1988).
6. Authier, N., Gillet, J., Fialip, J., Eschalier, A. & Coudore, F. *Neurotoxicology* **24**, 797-805 (2003).
7. Konig, M. et al. *Nature*. **383**, 535-538 (1996).
8. Rubinstein, M. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 3995-4000 (1996).
9. Zimmer, A. et al. *J Neurosci*. **21**, 9499-9505 (2001).
10. Zimmer, A. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 2630-2635 (1998).
11. Escoubas, P., Bernard, C., Lambeau, G., Lazdunski, M. & Darbon, H. *Protein Sci*. **12**, 1332-1343 (2003).
12. Cupo, A. & Jarry, T. *J Neuroimmunol*. **8**, 57-67 (1985).
13. Hylden, J. & Wilcox, G. *Eur J Pharmacol*. **67**, 313-316 (1980).
14. Mestre, C., Pelissier, T., Fialip, J., Wilcox, G. & Eschalier, A. *AJ Pharmacol Toxicol Methods*. **32**, 197-200 (1994).
15. Escoubas, P. et al. *J Biol Chem*. **275**, 25116-25121 (2000).
16. Ettaiche, M., Deval, E., Cougnon, M., Lazdunski, M. & Voilley, N. *J Neurosci*. **26**, 5800-5809 (2006).
17. Matthes, H. et al. *J Neurosci*. **18**, 7285-7295 (1998).
18. Baron, A., Waldmann, R. & Lazdunski, M. *J Physiol*. **539**, 485-494 (2002).
19. Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M. & Voilley, N. *J Neurosci*. **22**, 10662-10670 (2002).
20. Wu, L. et al. *J Biol Chem*. **279**, 43716-43724 (2004).
21. Wemmie, J., Price, M. & Welsh, M. *Trends Neurosci*. **29**, 578-586 (2006).
22. Chen, X., Kalbacher, H. & Gründer S. *J Gen. Physiol*. **127**, 267-76 (2006).
23. Sar, M., Stumpf, W.E., Miller, R.J., Chang, K.J. & Cuatrecasas, P. *J Comp Neurol*. **182**, 17-37 (1978).

SUPPL FIGURE 1: Effect of PcTx1 on ASIC currents recorded from mouse dorsal spinal neurons. Original currents recorded from three typical neurons showing the effect of PcTx1 at a dose that fully inhibits heterologously expressed homomeric ASIC1a current¹⁵: from left to right, a PcTx1-inhibited current, a mixed half-inhibited and a PcTx1-resistant current. For each neuron, a control current (γ) and a current in the presence of 20 nM PcTx1 (λ) are shown. Currents were recorded at -50 mV and activated by a pH drop from 7.4 to 6 every minute.

SUPPL FIGURE 2: PcTx1 and paw pressure in healthy rats. Time course of the effects of PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle (10 μ l) on mechanical nociception. Evoked mechanical nociception was scored using the Paw pressure test. AUC \pm sem values correspond to area under the time course curves. * P <0.05 vs vehicle.

SUPPL FIGURE 3: Analgesic effects of combinations of morphine and PcTx1. (a, b) Effects of different concentrations of morphine and/or PcTx1 i.t. injection on tail immersion

responses (n=10 per group). Mean \pm sem are shown. $P<0.005$, Morphine and PcTx1 vs PcTx1; two-way analysis of variance (ANOVA).

SUPPL FIGURE 4: Effects of treatment with μ , κ and δ opioid antagonists alone on tail immersion responses (n=10 per group). NAL = naloxone, NAZE = naloxonazine, nor-BNI = norbinaltorphimine, NALTR = naltrindole. AUC \pm sem values correspond to area under the time course curves.

SUPPL FIGURE 5: ASIC1a and Met-Enkephalin expressions in the dorsal horn of mouse spinal cord. ASIC1a expression detected by *in situ* hybridization (red) is distributed throughout the dorsal horn. Met-Enkephalin detected by immunohistochemistry (green) is present throughout the gray matter as described in the literature²³. The overlay (right picture) shows a colocalization in the different laminae of the dorsal horn (yellow). Close-up pictures (A-I) reveal that a majority of cells expresses ASIC1a and Met-Enkephalin (horizontal arrows) although some cells express only ASIC1a (pointing-down arrows) or only Met-Enkephalin (pointing-up arrows).

SUPPL FIGURE 6: (a) Effect of i.t. injection of specific antisense directed against the ASIC1a subunit on thermal nociception in wild type mice and Penk1 deficient mice. Six groups of mice were i.t. injected daily during 3 days with 10 μ l of solution containing either 10 μ g of ASIC1a-Antisense, 10 μ g of the mismatch ODN, or the vehicle alone. Mice (n=10 per group) were tested for nociceptive responses to a noxious thermal stimulus (Tail immersion test) at different times after antisense injection. The response scale was measured in seconds (sec) for the latency of tail withdrawal from the water bath. Results are given as mean \pm sem. *** $P<0.001$ vs vehicle. **(b) Effect of specific antisense directed against the ASIC1a subunit, and mismatch, (20 μ g/day/mouse/3 days, i.t.) on Met-Enkephalin concentration in CSF.** Fold-increase in Met-enkephalin CSF extracts are normalized to vehicle value. Mean \pm sem *** $P<0.001$ vs vehicle.

SUPPL FIGURE 7: Effects of i.c.v. injections of PcTx1 or morphine on locomotor behaviour in healthy mice. (a) Accelerating Rotarod. Accelerating rotarod trained mice (n=10 per group) were i.c.v. injected with PcTx1 (0.1 nmole) or morphine (31 nmoles) or vehicle (10 μ L). Latency to fall was measured 10 minutes after injection. Data were expressed as average latency to fall \pm sem *** $P<0.001$ vs morphine. **(b) Spontaneous activity monitoring.** Spontaneous locomotor activity of mice (n=10 per group) (Ten minutes after injection, the spontaneous locomotor activity was monitored for 60 min. The compounds,

morphine (31 nmoles) PcTx1 (0.1 nmole) or vehicle (10 μ L) were administered i.c.v. and locomotor activity was monitored for 180 min. Data were expressed as the number of light beams broken (counts) during the 60 min test period (mean total locomotor activity \pm sem) *** P <0.001 vs morphine.

6.2 Perspectives

À travers ces travaux, nous avons pour la première fois mis en évidence une relation entre l'inhibition d'un canal ASIC et le relargage d'un peptide opioïde endogène, la Met-enképhaline. Ces effets spectaculaires, induisant des effets analgésiques aussi importants que ceux de la morphine injectée à fortes doses, sont obtenus par l'injection de très faibles quantités d'un petit peptide. Malheureusement, ce peptide ne semble pas traverser la barrière hémato-encéphalique car nous n'avons pas observé d'effets lors d'une injection intranasale du peptide en solution. Cependant, d'autres auteurs ont décrit un effet neuroprotecteur majeur du venin de *Psalmopeus cambregei* administré en intranasal ((Xiong et al. 2004; Pignataro et al. 2007).

De nombreuses questions posées restent sans réponses. La question la plus cruciale concerne la localisation exacte des canaux ASIC1a responsables du relargage de Met-enképhaline et le mécanisme par lequel l'inhibition d'ASIC1a induit ce relargage. En effet, si le mécanisme et la localisation du canal effecteur étaient connus, il serait alors envisageable de mieux définir la cible médullaire et donc de trouver des effecteurs solubles mimant l'action de PcTx1. D'autres études sont évidemment nécessaires avant d'envisager une utilisation clinique de ce composé. Ces études pourraient dans un premier temps s'attacher à comparer les effets indésirables liés à l'utilisation de la morphine à ceux de PcTx1. J'ai entrepris, sans succès en raison de problèmes techniques d'observer la dépression respiratoire induite par PcTx1 en utilisant des pléthismographes adaptés aux souris. Cela mériterait d'être étudié à nouveau dans de meilleures conditions matérielles. D'autres effets indésirables comme l'induction du prurit lié à la morphine pourraient être plus facilement étudiés. Mon expérience, qui n'a pas été confirmée par une étude sérieuse, semble aller dans le sens d'une absence de prurit après injection de PcTx1. Enfin, la durée d'action des effets de PcTx1 devrait également être mesurée dans divers tests. Une étude des taux de Met-enképhaline circulants dans le LCR suivant une injection de PcTx1 pourrait aussi nous donner d'autres indications sur le mode de relargage de la Met-enképhaline. L'autre effet indésirable qui pourrait être mesuré est la constipation pharmaco-induite par la morphine. De toute évidence, nos résultats montrent que PcTx1 et sa cible moléculaire, les canaux ASIC1a médullaires ont un

potentiel thérapeutique non négligeable et je suis persuadé que d'autres études à venir compléteront ce travail. Enfin, d'autres questions soulevées par l'étude des effets de PcTx1 sur les souris invalidées pour le gène ASIC2 restent en suspens. En effet, PcTx1 n'aurait qu'un effet analgésique partiel sur ces souris et les taux de base Met-enképhaline de ces souris sont significativement inférieurs à ceux observés chez les souris sauvages....

Enfin, il reste à découvrir l'effecteur endogène des canaux ASIC. Si plusieurs peptides comme le NPFF, le NPSF et plus récemment le NO (Cadiou et al. 2007), sont des modulateurs de l'activité des canaux ASIC, nous n'avons pas encore découvert, malgré d'importants efforts l'inhibiteur endogène des canaux ASIC, et en particulier d'ASIC1a.

PcTx1 est un outil moléculaire particulièrement intéressant et des études récentes sur ASIC1a dans le système nerveux offrent d'autres perspectives thérapeutiques pour cette molécule. Les travaux de Friesen et collaborateurs (Friesen et al. 2007) montrent qu'une inhibition de ce canal pourrait avoir un effet protecteur dans l'évolution des maladies inflammatoires du système nerveux central. La physiopathologie de ces maladies particulières reste mystérieuse et les traitements actuels sont peu efficaces et ne permettent dans les meilleurs des cas qu'un ralentissement de la progression inexorable de ces maladies. Nous projetons d'étudier les auto-anticorps développés par l'organisme au cours de ces agressions du système nerveux central dans le liquide céphalorachidien et le sérum de patients malades. Nous espérons que cette étude permettra de mieux comprendre et donc de mieux soigner ces maladies inflammatoires du système nerveux central particulièrement invalidantes. D'autres études sont également en cours pour d'autres maladies chroniques du système nerveux central comme certains syndromes épileptiques telle l'encéphalite de Rasmussen dont la physiopathologie mal connue ne permet pas d'envisager d'autre traitement que la déconnection hémisphérique sont aussi dans la ligne de mire de notre recherche d'autoanticorps dirigés contre des canaux ioniques et autres protéines membranaires exprimées dans le système nerveux central.

7 Annexe

7.1 *TREK1, a K^+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia (EMBO journal-2004)*

TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia

C Heurteaux¹, N Guy¹, C Laigle,
N Blondeau, F Duprat, M Mazzuca,
L Lang-Lazdunski, C Widmann,
M Zanzouri, G Romey and M Lazdunski*

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, Institut Paul Hamel, Sophia-Antipolis, Valbonne, France

TREK-1 is a two-pore-domain background potassium channel expressed throughout the central nervous system. It is opened by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids. It is inhibited by neurotransmitters that produce an increase in intracellular cAMP and by those that activate the Gq protein pathway. TREK-1 is also activated by volatile anesthetics and has been suggested to be an important target in the action of these drugs. Using mice with a disrupted TREK-1 gene, we now show that TREK-1 has an important role in neuroprotection against epilepsy and brain and spinal cord ischemia. *Trek1*^{−/−} mice display an increased sensitivity to ischemia and epilepsy. Neuroprotection by polyunsaturated fatty acids, which is impressive in *Trek1*^{+/+} mice, disappears in *Trek1*^{−/−} mice indicating a central role of TREK-1 in this process. *Trek1*^{−/−} mice are also resistant to anesthesia by volatile anesthetics. TREK-1 emerges as a potential innovative target for developing new therapeutic agents for neurology and anesthesiology.

The EMBO Journal (2004) 23, 2684–2695. doi:10.1038/sj.emboj.7600234; Published online 3 June 2004

Subject Categories: neuroscience; molecular biology of disease

Keywords: epilepsy; ischemia; neuroprotection; 2P domain K⁺ channel; volatile anesthetics

Introduction

Two-pore-domain potassium channels (K_{2P} channels) form a novel class of K⁺ channels identified in various types of neurons (Kim *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996; Lesage and Lazdunski, 2000; Talley *et al.*, 2003). They are open at membrane potentials across the physiological range and are therefore likely to contribute to the background or leak currents that help set the resting membrane potential and oppose depolarizing influences. They are key components in shaping the characteristics of neuronal excitability. TREK-1 (Fink *et al.*, 1996) is expressed throughout the central nervous

system (Fink *et al.*, 1996; Lauritzen *et al.*, 2000; Maingret *et al.*, 2000b; Hervieu *et al.*, 2001; Talley *et al.*, 2001) and is an important member of this family. It is the probable mammalian homolog of the Aplysia S-type K⁺ channel (Siegelbaum *et al.*, 1982; Patel *et al.*, 1998), a channel involved in simple forms of learning and memory. TREK-1 is activated by membrane stretch and intracellular acidification (Patel *et al.*, 1998; Maingret *et al.*, 1999b). TREK-1 is opened by arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as well as lysophospholipids (LPLs) (Patel *et al.*, 1998; Maingret *et al.*, 2000b). On the other hand, PUFAs and LPLs are potent protective agents against forebrain ischemia and seizures, and it has been proposed that this effect results, at least in part, from their action on TREK channels (Lauritzen *et al.*, 2000; Blondeau *et al.*, 2001, 2002). TREK-1 probably has a central role in the control of excitability by a variety of neurotransmitters. TREK-1 is potently inhibited by neurotransmitters that produce an increase in intracellular cAMP (Patel *et al.*, 1998) and also by those that activate the Gq protein pathway (Lesage *et al.*, 2000; Chemin *et al.*, 2003). The inhibition of TREK channels by glutamate via the activation of group I Gq-coupled metabotropic glutamate receptors requires PTX-insensitive G proteins coupled to phospholipase C (Chemin *et al.*, 2003). TREK-1 is also activated by volatile anesthetics and suggested to be a target in the action of these drugs (Patel *et al.*, 1999). This paper definitively shows that TREK-1 plays a major role in the PUFAs/LPLs-induced neuroprotection against epilepsy and ischemia and that TREK-1-deficient mice display resistance to anesthesia.

Results

Generation and characterization of TREK-1 null mice

The TREK-1 gene of mice was disrupted through homologous recombination using a Cre/loxP-based strategy (Figure 1A). The CRE-mediated excision of exon 3 led to the deletion of the first transmembrane domain of the TREK-1 channel. Heterozygous matings produced offspring with normal Mendelian ratios (Figure 1B and C). Homozygous (*Trek1*^{−/−}) mutant mice were healthy, fertile and did not display any visible morphological differences. PCR amplification of testicular cDNA (a tissue where TREK-1 is abundant; Hervieu *et al.*, 2001; Talley *et al.*, 2001) showed that the null mutant only expressed a truncated transcript (Figure 1D). Sequencing of this transcript confirmed that it results from the deletion of the 311 nucleotides of the targeted exon (Figure 1D). The brain morphology of *Trek1*^{−/−} mice appeared normal. In brain regions known to express the KCNK2 gene, no TREK-1 messenger RNA was detected by *in situ* hybridization using a probe recognizing the 3'-end of the mRNA (Figure 1E). The absence of the TREK-1 protein in null mutants was confirmed by the lack of immunoreactivity to specific anti-TREK-1 antibody (Maingret *et al.*, 2000a) in brain areas such as the cortex or the hippocampus where it is highly expressed (Figure 1F).

*Corresponding author. Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR 6097, Institut Paul Hamel, 660 Route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France.
Tel.: +33 493 957702/03; Fax: +33 493 957704;
E-mail: ipmc@ipmc.cnrs.fr

¹These authors contributed equally to this work

Received: 10 March 2004; accepted: 19 April 2004; published online: 3 June 2004

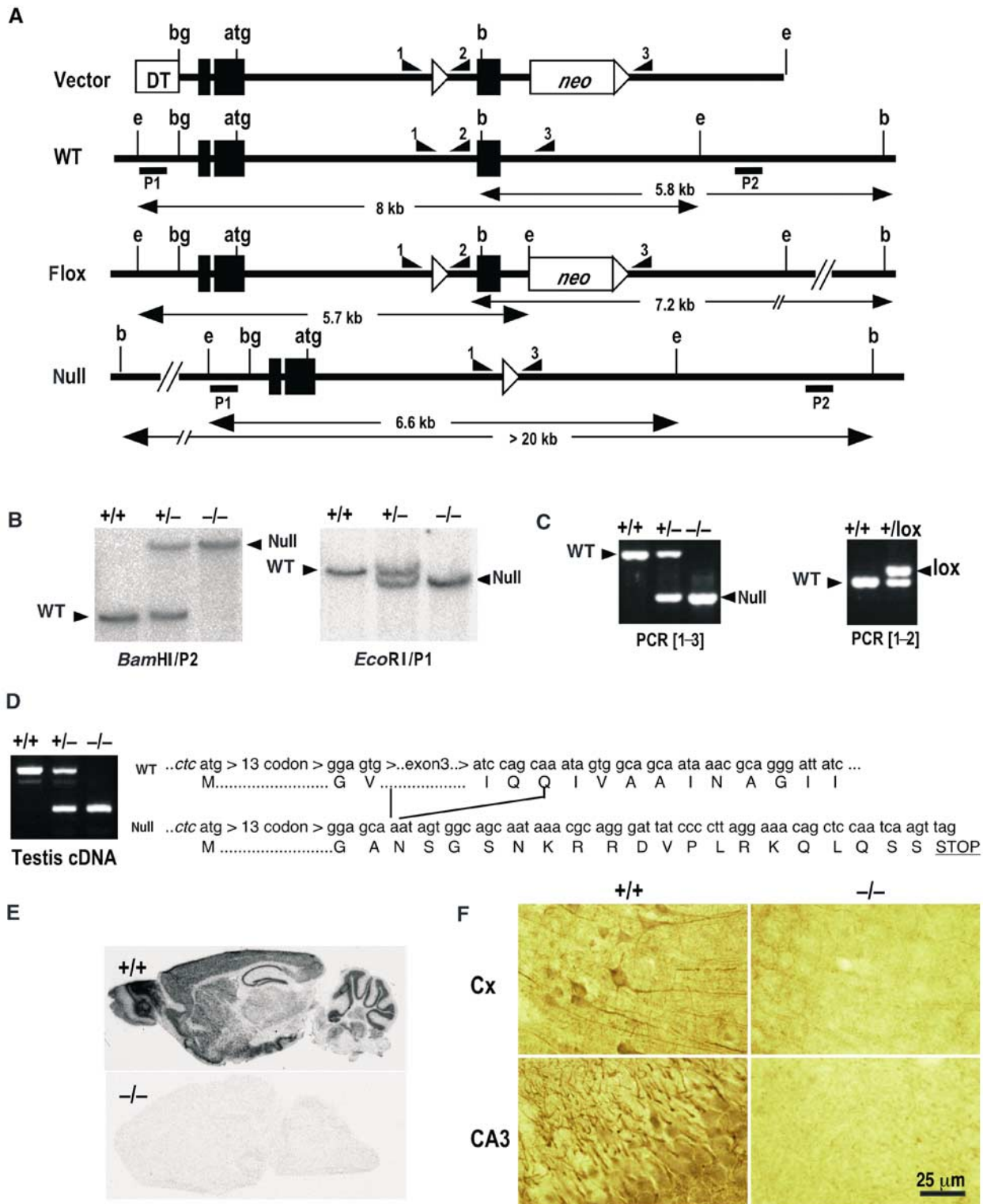


Figure 1 Disruption of the KCNK2 gene. (A) Targeting vector (\blacktriangleright = loxp), native (WT) and recombined floxed (Flox) alleles. External probes used to characterize homologous recombination are designated as P1 and P2. Arrowheads (1–3) display locations of the primers used for PCR analysis of the different products. Double-headed arrows indicate the expected size of restriction fragments for Southern analysis (bg = *Bgl*II; b = *Bam*HI; e = *Eco*RI). (B) Southern blot analysis of *Eco*RI- and *Bam*HI-digested tail DNA from wild-type (+/+), heterozygous (+/-) or homozygous (-/-) KCNK2 mice probed with P1 and P2, respectively. (C) PCR amplification from tail genomic DNA. (D) PCR amplification from +/+, +/- and -/- mouse testis cDNA with primers surrounding the deletion. (E) *In situ* hybridization analysis shows the lack of mRNA expression in *Trek*^{-/-} mouse brain on X-ray films. (F) Immunocytochemical TREK-1 staining in neocortex (Cx) and hippocampal CA3 subfield sections using a specific α -TREK-1 antibody (Lauritzen *et al*, 2000).

The TREK-1 mutation did not interfere with the mRNA expression in brain and cerebellum of other K_{2P} channels and of the GABA α 6 subunit whose deletion causes an increased expression of TASK-1, another K_{2P} channel (Brickley *et al*, 2001) (Figure 2A). There was no compensatory upregulation of genes for other neuronal K_{2P} channels such as TWIK-1, TREK-2, TRAAK, TASK-1, TASK-3 or the GABA α 6 subunit in $Trek1^{-/-}$ mice ($P < 0.01$).

Primary behavioral testings (see Supplementary Materials and methods) showed that the TREK-1-deficient mice did not display any abnormal phenotype in appearance (Figure 2B). There was no difference in skin color, body tone or body weight. $Trek1^{-/-}$ mice did not display any abnormalities in body position, respiration or spontaneous activity. Stereotypies or tremor were not observed. There was no difference in frequency and volume of defecation or urination. Locomotor activity of the $Trek1^{-/-}$ mutant was not different from $Trek1^{+/+}$ control in the open field test as well as in the rotarod. No difference was seen in the

touch escape response or in the positional passivity test. Recordings of reflexes and autonomic functions did not show any significant differences. Scorings were comparable in the visual placing test, grip strength, corneal and pinna reflex and in the righting reflex. No significant difference was seen between $Trek1^{+/+}$ and $Trek1^{-/-}$ mice in the object recognition test.

For comparative purpose, we have also deleted the TRAAK gene (see Supplementary Materials and methods and Supplementary Figure 1) to be able to evaluate the respective properties of $Trek1^{-/-}$ and $Traak^{-/-}$ mice. The TRAAK channel is closely related to the TREK-1 channel. Like TREK-1, it is a background outward rectifier K^+ channel, opened by membrane stretch, cell swelling and activated by PUFAs and LPLs. However, unlike TREK-1, the TRAAK channel is not activated by intracellular acidification (Maingret *et al*, 1999b) nor volatile anesthetics (Patel *et al*, 1999) and not inhibited by neurotransmitters that increase cAMP via a protein kinase A-dependent phosphorylation process (Fink

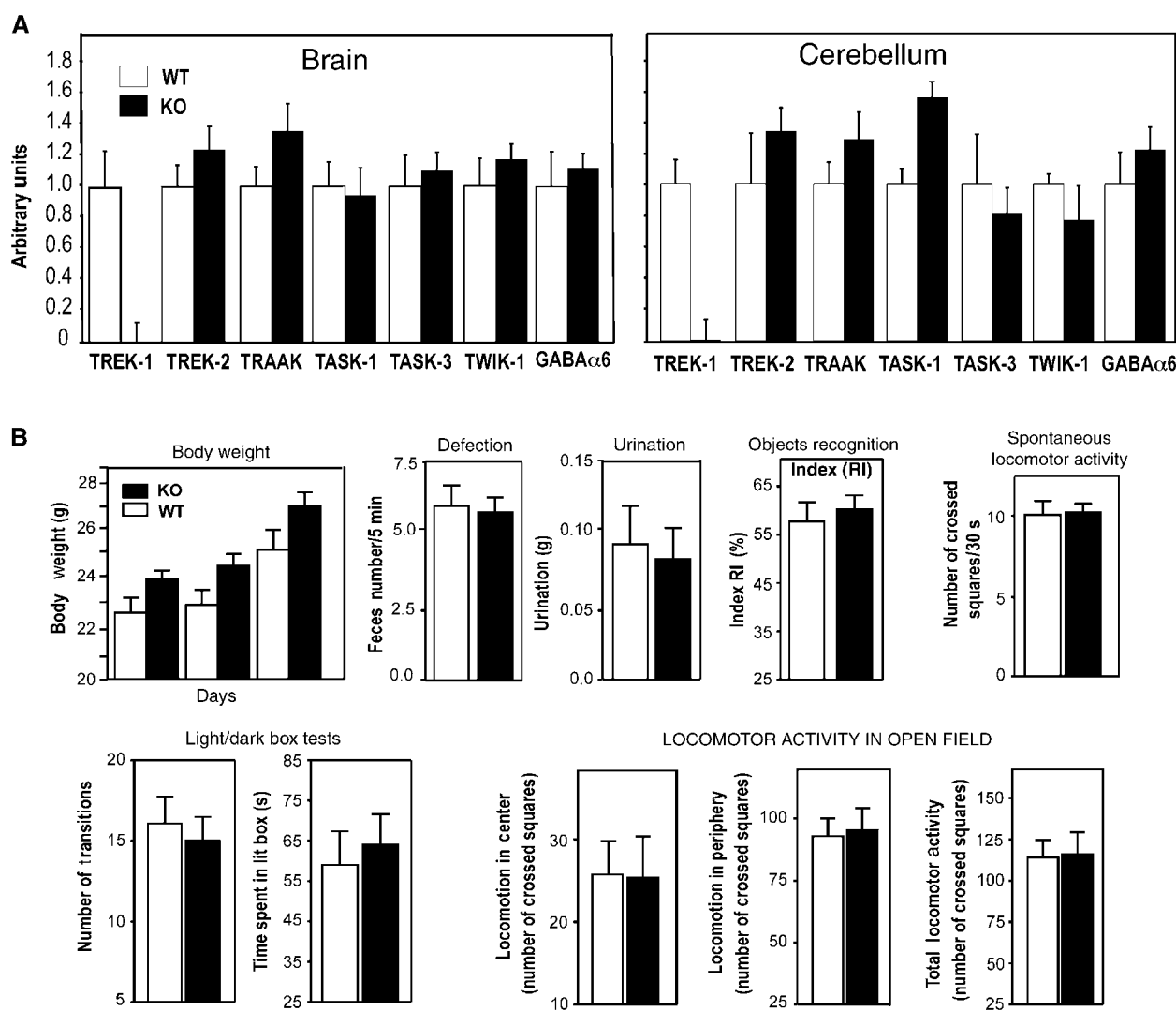


Figure 2 Characterization of TREK-1 null mice. (A) Relative expression of TREK-1, TREK-2, TRAAK, TASK-1, TASK-3 and GABA α 6 mRNA levels in brain and cerebellum from $Trek1^{-/-}$ and $Trek1^{+/+}$ mice. Mean levels of gene expression, normalized to cyclophilin D, are displayed in arbitrary units on the vertical axis ($n = 3$ mice, $P < 0.01$, Student's t -test). (B) Primary behavioral test battery showing the lack of abnormal phenotype in TREK-1-deficient mice. Results are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical significance was set at $P < 0.05$ (Student's t -test or a Mann-Whitney test).

et al, 1998; Maingret *et al*, 1999a) or by those that activate the Gq protein pathway (Chemin *et al*, 2003).

Electrophysiological recordings

To test whether TREK-1 currents could be recorded in neurons from wild-type mice and were absent in neurons from TREK-1 null mice, we performed patch clamp recordings in striatal neurons in culture. These neurons were chosen because they strongly express TREK-1 but not TREK-2 or TRAAK channels (Hervieu *et al*, 2001; Talley *et al*, 2001), two K_{2P} channels that are also activated by membrane stretch, PUFAs and LPLs (Lesage and Lazdunski, 2000; Lesage *et al*, 2000; Patel and Honoré, 2001). In the striatum, the primary type accounting for 85% of the neurons is the GABAergic medium-size spiny neuron (Kita and Kitai, 1988). Using an antibody against GABA, we have checked that most neurons in our culture were indeed GABAergic (data not shown). The resting membrane potential of the striatal neurons from *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice was not significantly different (Student's *t*-test, *P* = 0.0586) with -47.2 ± 1.6 mV (*n* = 30) and -51.5 ± 7.5 mV (*n* = 26), respectively. Neurons with resting membrane potential less negative than -30 mV were discarded. Using the inside-out configuration and in the presence of K⁺ channels blockers (TEA, 4-AP and glibenclamide), a native TREK-1-like current was regularly recorded in cultures from wild-type mice. This current was reversibly activated by 10 μM arachidonate (AA) (Figure 3A) and by internal acidification (Figure 3B), as previously described (Maingret *et al*, 1999b, 2000b). The conductance was 55.8 ± 0.9 pS at +50 mV (*n* = 6), which is close to the conductance of the cloned TREK-1 (Patel *et al*, 1998). The outwardly rectifying current reversed around the potassium equilibrium potential (Figure 3C). Like TREK-1 (Patel *et al*, 1998), the native current was also activated by membrane stretch (Figure 3D). The effect of volatile anesthetics was also studied on the TREK-like current recorded in striatal cultures from wild-type mice (Figure 3E, inset) and in TREK-1-transfected COS cells (Supplementary Figure 2A and B). Halothane in striatal neurons (Figure 3E, inset) as well as halothane and sevoflurane in COS cells (Supplementary Figure 2A and B) highly stimulated a TREK-1 channel activity. The loss of functional TREK-1 channels in TREK-1 null mutants was demonstrated by outside-out patch clamp recordings in striatal neurons. Figure 3E and F shows that in the presence of TEA and 4-AP to block voltage-dependent K⁺ channels, there was no expression of basal current in wild-type neurons and in null mutants. Upon perfusion with the TREK-1 activator AA (20 μM), a robust TREK-1-like current was recorded in *Trek1*^{+/+} neurons, whereas no significant variation was observed in *Trek1*^{-/-} neurons. This electrophysiological analysis confirmed (i) that the TREK-1 deletion had taken place and (ii) that there was no compensatory upregulation of genes for other neuronal K_{2P} channels.

Role for the TREK-1 channel in the control of epileptogenesis

The high level of TREK-1 channel expression in the cortex and thalamic nuclei and its colocalization on GABAergic cortical and hippocampal interneurons, which are inhibitory to pyramidal cell activity (Hervieu *et al*, 2001; Talley *et al*, 2001), suggest a possible involvement of the TREK-1 channel in the control of epileptic seizures. To analyze the seizure

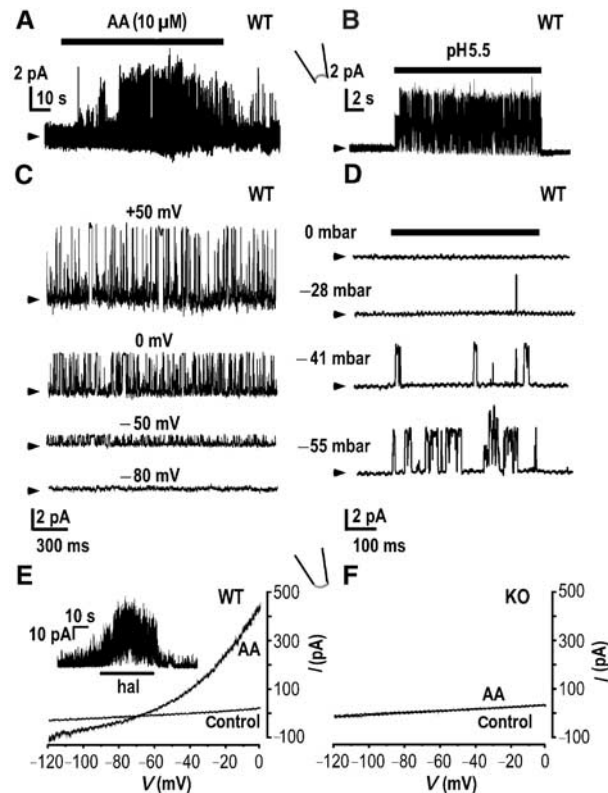


Figure 3 Patch clamp recordings in striatal neurons from *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice. (A) Activation of the TREK-like current by 10 μM AA. (B) Activation of the TREK-like current by internal acidification to pH 5.5. Currents in (A, B) were recorded in inside-out configuration at 0 mV. (C) Single channel currents recorded as in (A) at various potentials as indicated. (D) Activation by membrane stretch recorded as in (A) at various negative pressures as indicated. (E) Typical TREK-like current recorded in outside-out configuration before (control) and after activation by 10 μM AA in striatal neurons from wild-type mice (WT). Values are average of two consecutive current traces elicited with voltage ramps starting from 0 mV down to -120 mV, from a holding potential of 0 mV. Inset: Effect of 2 mM halothane (hal) on TREK-like activity recorded at 0 mV in outside-out configuration. (F) Same recordings in neurons from TREK-1 knockout mice (KO).

susceptibility of *Trek1*-deficient mice, we used the response to kainic acid (KA, an agonist of glutamate receptor) and to pentylenetetrazol (PTZ, a GABA_A receptor antagonist), as an overall index of neuronal network excitability. *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice were injected intraperitoneally with epileptogenic doses of KA (22 mg/kg) or PTZ (40–55 mg/kg) and the degree of seizures was scored (Tsirka *et al*, 1995). *Trek1*^{-/-} mice were much more vulnerable to KA-induced seizures than *Trek1*^{+/+} mice as assessed by either seizure score or mortality rate (Figure 4A). More than 75% of the mutant mice died within 3 days of KA administration, compared with 3% of *Trek1*^{+/+} mice, and the average maximum intensity of seizures observed in *Trek1*^{-/-} mice increased by 33%. A comparison of electroencephalogram (EEG) patterns in the hippocampus of *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice is shown in Figure 4F. A spectral analysis of EEG activity shows that 45 min following KA treatment (22 mg/kg), *Trek1*^{-/-} mice developed generalized convulsive seizures with the appearance of bilateral spike-wave discharges with spike frequencies and amplitudes higher than in *Trek1*^{+/+} mice (Figure 5A and B).

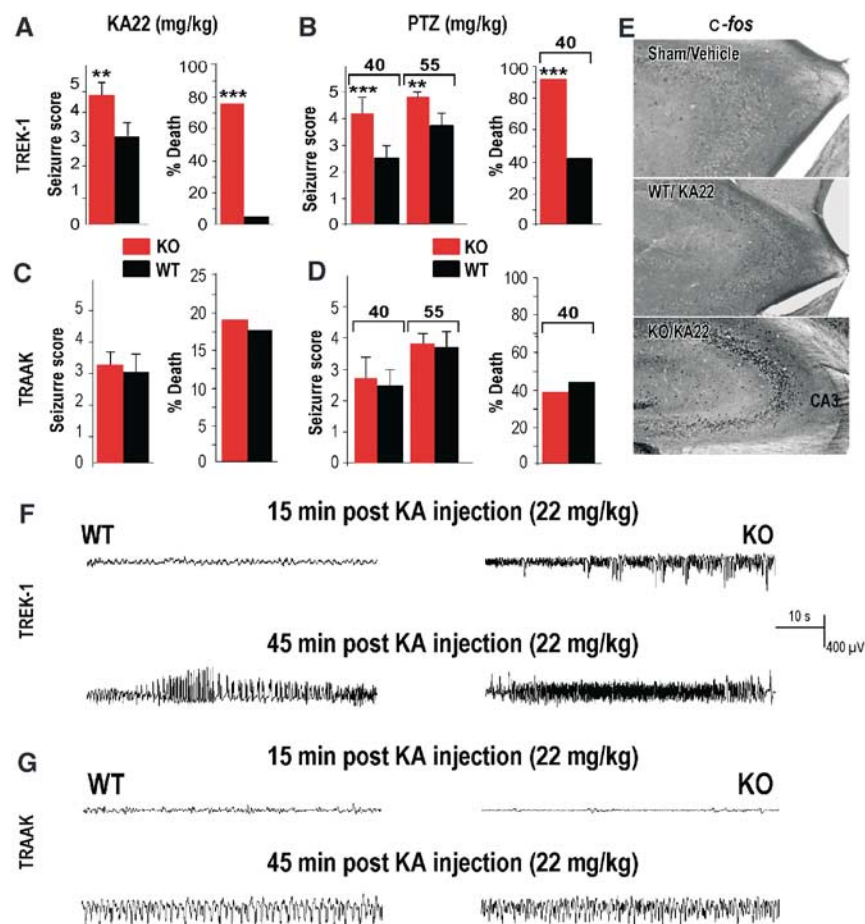


Figure 4 Increased susceptibility to epileptic agents in TREK-1-deficient mice. (A, B) Seizure behavior and mortality rate in wild-type and mutant TREK-1 mice after KA (A) or PTZ injection (B). (C, D) Seizure behavior and mortality rate in wild-type and mutant TRAAK mice after KA (C) or PTZ (D) injection. Seizures were ranked as follows: 1, immobility; 2, myoclonic jerks of the neck and head with brief twitching movements; 3, unilateral clonic activity; 4, bilateral forelimb tonic and clonic activity; 5, generalized tonic-clonic activity with loss of postural tone including death from continuous convulsions. Values represent mean \pm s.e.m. of the maximum seizure intensity recorded for each mouse ($n=20$ per genotype). *Significantly different from vehicle-treated wild type (KA treatment 22 mg/kg), ** $P<0.001$, *** $P<0.0001$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. (E) Increased expression of *c-fos* protein in CA3 pyramidal neurons in *Trek1*^{-/-} mice 120 min after KA treatment (22 mg/kg). (F) EEG following KA (22 mg/kg) showing the increased KA susceptibility of *Trek1*^{-/-} mice as compared to *Trak1*^{-/-} mice (G) ($n=10$ per genotype).

Trek1^{-/-} mice also showed an increased sensitivity to PTZ-induced seizures (Figure 4B). Unlike the slow progression of motor symptoms observed in the KA-induced seizures, PTZ induced abrupt general tonic-clonic seizures within 5 min of injection. At a dose of 55 mg/kg, more than 90% of *Trek1*^{-/-} mice died from continuous tonic-clonic convulsions, whereas 60% of *Trek1*^{+/+} mice survived (Figure 4B).

Activation of *c-fos*, in regions susceptible to kainate injection, is routinely used as a biochemical marker of neuronal excitability (Smeyne *et al*, 1992). The expression of the *c-fos* protein was drastically enhanced in *Trek1*^{-/-} mice compared to *Trek1*^{+/+} mice, particularly in CA3 subfield at 120 min after KA injection (Figure 4E).

A comparative study was carried out with the TRAAK channel. TRAAK-deficient mice did not display an increased sensitivity to epilepsy (Figures 4C, D and G and 5C). Taken together, all these results show that, unlike TRAAK null mice, TREK-1-deficient mice are hypersensitive to kainate and PTZ-

induced seizures and point to TREK-1 as a key target for epileptogenesis.

TREK-1 channel in brain and spinal cord ischemia and its major role in the neuroprotection provided by PUFAs and LPLs

Linolenic acid (LIN) or lysophosphatidylcholine (LPC) at a dose of 500 nmol/kg injected 30 min before the KA administration induced a potent decrease of the seizure activity in *Trek1*^{+/+} mice but had no effect in *Trek1*^{-/-} mice (Figure 6A and B). The seizure score or the mortality rate shows that LIN- or LPC-injected *Trek1*^{+/+} mice were much less vulnerable to KA-induced seizures than vehicle-injected *Trek1*^{+/+} mice, while LIN- or LPC-injected *Trek1*^{-/-} mice were not protected (Figure 6A). More than 78% of the mutant mice treated with LIN or LPC died within 3 days of KA22 administration, compared with 3% of LIN- or LPC-injected *Trek1*^{+/+} mice, and the average maximum intensity of seizures observed in treated *Trek1*^{-/-} mice increased by 38%. EEG

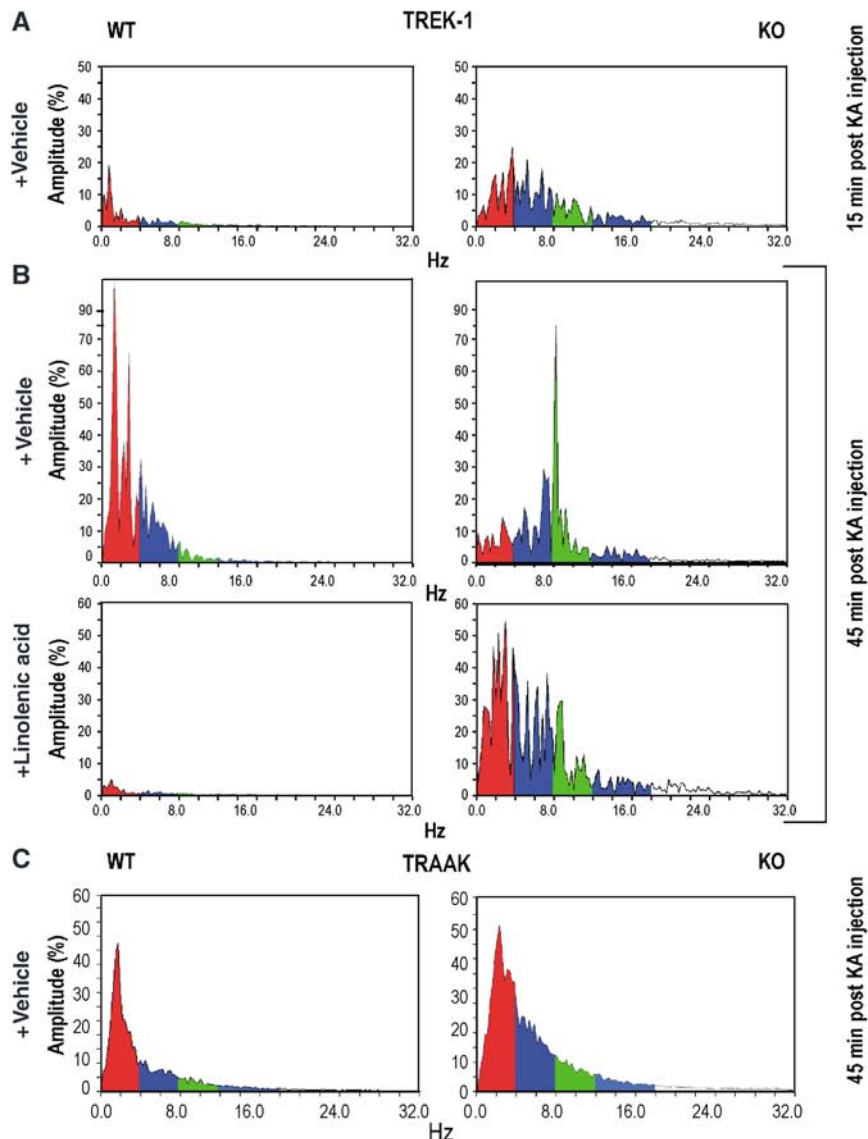


Figure 5 Spectral profiles of EEG recordings following KA (22 mg/kg) injection in TreK and TraaK mice. (A) Increased KA susceptibility of *Trek1*^{-/-} mice. (B) No anticonvulsive effect of LIN injection in *Trek1*^{-/-} mice. (C) No difference in KA susceptibility between vehicle-treated *Traak*^{-/-} (KO) and *Traak*^{+/+} (WT) mice. Spectral profiles of EEG recordings (*n* = 10 per genotype and treatment) are shown 15 and 45 min following KA injection in vehicle-treated *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice and 45 min following KA injection in LIN (500 nmol/kg)-treated *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice. Spectral profiles of EEG recordings in vehicle-treated *Traak* mice are shown 45 min following KA injection.

patterns in the hippocampus of *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice treated with LIN (Figure 6B) and their spectral analysis of EEG activity (Figure 5B) confirm the lack of efficiency of LIN treatment in null mutant mice. The same protocol applied to TRAAK mice showed no difference in the neuroprotective effect of LIN or LPC between *Traak*^{+/+} and *Traak*^{-/-} mice (data not shown). This strongly suggests that the antiepileptic effect of PUFAs or LPLs is directly related to the activation of the TREK-1 channel.

Another important cause of neuronal damage is ischemia. *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice were submitted to a transient bilateral occlusion of common carotid arteries (CCAs) during systemic hypotension (mean arterial blood pressure (MABP) 30 ± 3 mmHg) maintained for 30 min. *Trek1*^{+/+} mice presented no sign of hyperexcitability in the days following a 30 min period of ischemia. In contrast, most of the knockout mice developed seizures of progressive severity during the

same time of reperfusion. More than 70% of *Trek1*^{-/-} mice died in the 3 days after ischemia compared with 34% of *Trek1*^{+/+} mice (Figure 6C; *P* < 0.001). LIN or LPC (500 nmol/kg) injected 30 min before the induction of global ischemia had no effect in *Trek1*^{-/-} mice, while it protected the *Trek1*^{+/+} mice against neuronal death and significantly increased their survival (Figure 6C). This observation strongly suggests that the neuroprotective effect of PUFAs or LPLs against global ischemia is directly related to the activation of the TREK-1 channel. The specificity of the TREK-1 channel in neuroprotection against ischemic injury is strengthened by results obtained with TRAAK-deficient mice, which did not display an increased sensitivity to ischemia (Figure 6C).

We also analyzed the role of TREK-1 in spinal cord ischemia. It is a devastating complication with resulting paraplegia, observed after repair of thoracic or abdominal

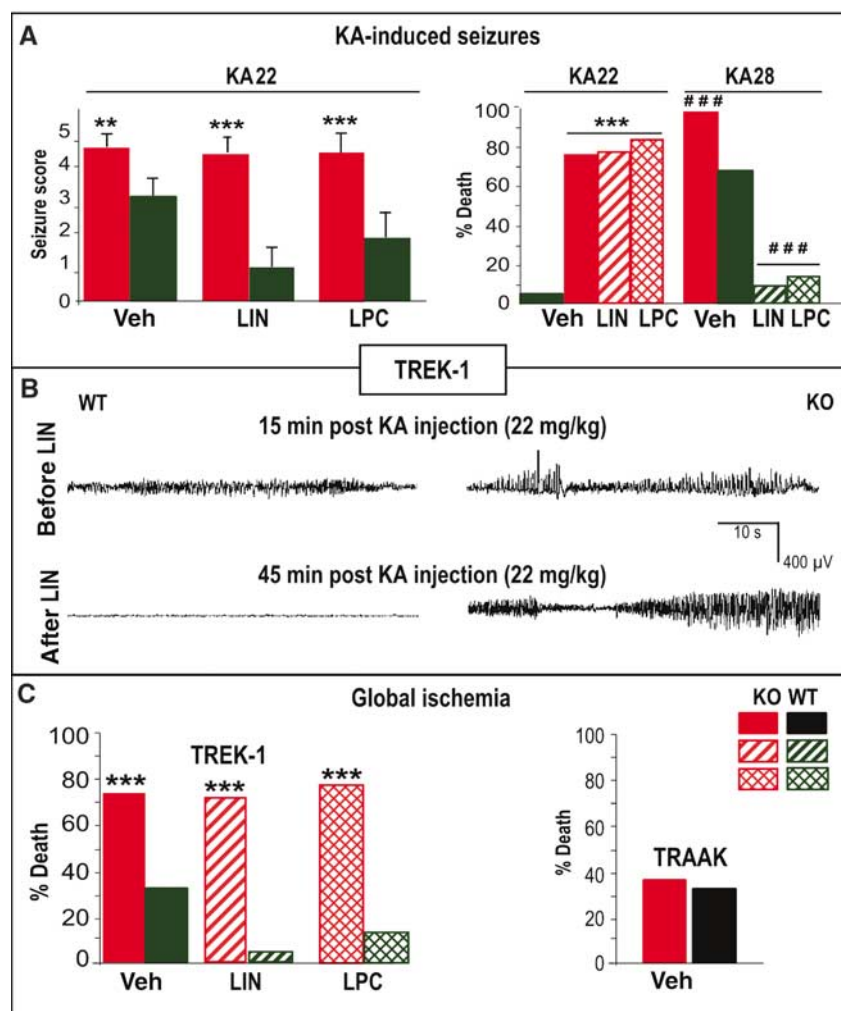


Figure 6 Increased vulnerability of TREK-1-deficient mice to ischemia and loss of the neuroprotective effect of LIN and LPC in *Trek1*^{-/-} mice. **(A)** Effect of LIN or LPC injection (500 nmol/kg) 10 min before KA treatment. **(B)** EEG recordings (15 and 45 min after KA treatment) in *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice with or without LIN (500 nmol/kg). **(C)** Increased mortality rate in vehicle (Veh)-, LIN- or LPC-treated *Trek1*^{-/-} mice following 30 min global ischemia (*n* = 20 per genotype). LIN and LPC were injected at a concentration of 500 nmol/kg 30 min before ischemia. *Significantly different from vehicle-treated wild type (KA treatment 22 mg/kg), #significantly different from vehicle-treated wild type (KA treatment 28 mg/kg), ***P* < 0.001, ****P* < 0.0001, ###*P* < 0.0001, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

aortic aneurysms or dissection (Kouchoukos and Dougenis, 1997). Combined occlusion of the aortic arch and left subclavian artery was performed to induce spinal cord ischemia in mice (Lang-Lazdunski *et al*, 2000). Values of mean femoral arterial blood pressure (MABP) recorded for 5 h throughout the procedure did not differ significantly between *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice (Table Ia). The susceptibility to spinal cord ischemia was much higher in null allele mice. A total of 75% of *Trek1*^{-/-} mice died within the first 3 h following 10 min ischemia compared with 14% of *Trek1*^{+/+} mice up to 24 h after the procedure (Table Ib; *P* < 0.001). All surviving *Trek1*^{+/+} mice recovered without any neurological deficit and failed to develop any form of neurological deficit during the subsequent 48 h. In contrast, surviving *Trek1*^{-/-} mice developed severe hind limb paralysis at the onset of reperfusion. They remained paralyzed during the first hours of reperfusion and retained deficits in motor function during the subsequent 48 h (Table Ib). Within 5 min following aortic crossclamping, *Trek1*^{-/-} mice had vesical relaxation with urination, which did not occur in *Trek1*^{+/+} mice, further indicating a lower tolerance to spinal cord ischemia.

Autopsies of *Trek1*^{-/-} mice did not reveal any severe abnormality in heart, lungs or major vessels.

TREK-1 channel in the mechanism of action of volatile anesthetics in vivo

Another interesting property of the TREK-1 channel concerns its sensitivity to activation by general volatile anesthetics (Patel *et al*, 1999), and we hypothesized (Patel *et al*, 1999) that TREK-1 might be involved in the mechanism of action of these agents. The comparative sensitivity to different volatile anesthetics of *Trek1*^{+/+} and *Trek1*^{-/-} mice was assessed by comparing the onset of anesthetic action, the loss of righting reflex (LORR) and the inspired minimum alveolar anesthetic concentration (MAC) values for each anesthetic in both. MAC is the minimum steady-state alveolar concentration of an inhalational anesthetic required to suppress a strong motor reaction to the noxious stimulus of tail-clamping in 50% of mice (Quasha *et al*, 1980). Figure 7A shows that knockout mice had a decreased sensitivity to chloroform and halothane, which are the most potent activators of the TREK-1 channel *in vitro* (Patel *et al*, 1999). Interestingly, the same

Table I Comparison of susceptibility to spinal cord ischemia in wild-type and TREK-1-deficient mice

(a) Physiological variables							
Genotype	Mean arterial blood pressure (mmHg)			Rectal temperature (°C)			
	Preischemia	Ischemia	Reperfusion	Preischemia	Ischemia	Reperfusion	
Trek1 ^{+/+}	71.9 ± 3.3	16.1 ± 6.2	67.4 ± 4.2	37.5 ± 0.4	37.3 ± 0.5	37.6 ± 0.3	
Trek1 ^{-/-}	73.2 ± 2.9	17.2 ± 2.4	69.7 ± 3.8	37.3 ± 0.3	37.2 ± 0.3	37.4 ± 0.2	

(b) Number of mice with their neurologic status (MSDI) and death rate at the onset of reperfusion and 1, 3 and 24 h after ischemia		MSDI							
Time after ischemia (h)	Genotype	0	1	2	3	4	5	6	Death
0	Trek1 ^{+/+}	0	7	0	0	0	0	0	0
	Trek1 ^{-/-} *	0	0	0	0	0	0	8	0
1	Trek1 ^{+/+}	1	6	0	0	0	0	0	0
	Trek1 ^{-/-} *	0	0	0	0	0	1	3	4
3	Trek1 ^{+/+}	7	0	0	0	0	0	0	0
	Trek1 ^{-/-} *	0	0	0	1	1	0	0	2
24	Trek1 ^{+/+}	6	0	0	0	0	0	0	1
	Trek1 ^{-/-} *	0	2	0	0	0	0	0	0

The neurologic score involved a six-point scale (0 (normal function) to 6 (severe paraplegia); Lang-Lazdunski *et al*, 2000). Motor sensory deficit indices (MSDIs) were analyzed with Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney U-test when significant. **P* < 0.05 versus wild-type mice.

type of results was obtained with sevoflurane and desflurane (Figure 7B), the most widely used agents in clinical anesthesia as well as isoflurane (Supplementary Figure 2C). The period of time necessary for the induction of anesthesia was longer, the concentrations required for LORR lower and the partial pressures of all anesthetics tested (i.e. MAC) were higher in Trek1^{-/-} mice. There was no significant difference in the respiratory rate between either genotype before induction of anesthesia and at the MAC value (Table II). In contrast with volatile anesthetics, no difference was seen between Trek1^{+/+} and Trek1^{-/-} mice upon injection of the barbiturate pentobarbital (Figure 7C), which produces anesthesia by acting on different GABA_A receptor subunits (Yamakura *et al*, 2001) and *in vitro* it has no effect on TREK-1 channel activity (Figure 7C), unlike halothane and sevoflurane (Supplementary Figure 2A and B). Pentobarbital did not affect the latency or the duration of LORR (Figure 7C) in null mutants. This latter result supports the idea that the differences observed are specific to volatile anesthetics and related to the TREK-1 channel.

Discussion

Potassium channels play a major role in the control of K⁺ homeostasis and in physiological and pathological functions that are associated with modifications of the electrical membrane potential. Many subtypes of K⁺ channels have been cloned in the past decades (Salkoff *et al*, 1992; Jan and Jan, 1997; Pongs, 1999; Kurachi *et al*, 1999). The mammalian two-pore-domain K⁺ channel family (Lesage and Lazdunski, 2000; Patel and Honoré, 2001; Lesage, 2003), and particularly the TREK-1 channel, has been proposed to play a key role in brain and spinal cord injuries (Lauritzen *et al*, 2000; Blondeau *et al*, 2002; Lang-Lazdunski *et al*, 2003). The lipid and mechano-gated TREK-1 channel is closely related to pathophysiological conditions, such as ischemia and epi-

lepsy. It is activated by arachidonic acid and other PUFAs, LPLs, cell volume expansion and internal acidosis. During the process of ischemia, arachidonic acid is released from the plasma and intracellular pH is decreased. These condition changes could potentially activate the lipid-sensitive mechano-gated K_{2P} channels, an activation that would occur to protect the neuronal cell against excessive and deleterious neuronal excitability and Ca²⁺ entry. On the other hand, the TREK-1 channel is inhibited by the activation of group I metabotropic glutamate receptors, known to be involved in brain disorders, including ischemia, epilepsy and neurodegenerative disorders (Bockaert *et al*, 1993; Bordin and Ugolini, 1999; Fagni *et al*, 2000). Group I metabotropic glutamate receptor antagonists are neuroprotectors, while agonists amplify the excitotoxic neuronal degeneration induced by glutamate (Nicoletti *et al*, 1996; Gasparini *et al*, 2002). In fact, injections of PUFAs and LPLs protect against brain and spinal cord ischemia as well as epileptic seizures (Lauritzen *et al*, 2000; Blondeau *et al*, 2001, 2002; Lang-Lazdunski *et al*, 2003). Riluzole, another activator of TREK-1 channel (Duprat *et al*, 2000), is also neuroprotective against ischemia (Pratt *et al*, 1992; Ettaiche *et al*, 1999; Lang-Lazdunski *et al*, 1999). Although the opening of lipid-sensitive mechano-gated K_{2P} channels has been presumed to be the significant factor in neuroprotection, the lack of specific blockers did not allow until now a direct demonstration of this property. Using mice with disrupted TREK-1 and TRAAK genes, the present study provides evidence for a major role of the TREK-1 channel in surviving excessive neuronal excitability and in resistance to forebrain and spinal cord ischemia. The absence of an increased sensitivity to ischemia and epilepsy in Traak^{-/-} mice demonstrates that the extreme vulnerability of Trek1^{-/-} mice is not a nonspecific effect due to the lack of an important K⁺ channel on neuronal excitability. Consequently, the TREK-1 channel can be considered to play a key role in the regulation of neuronal excitability. The high expression of the TREK-1

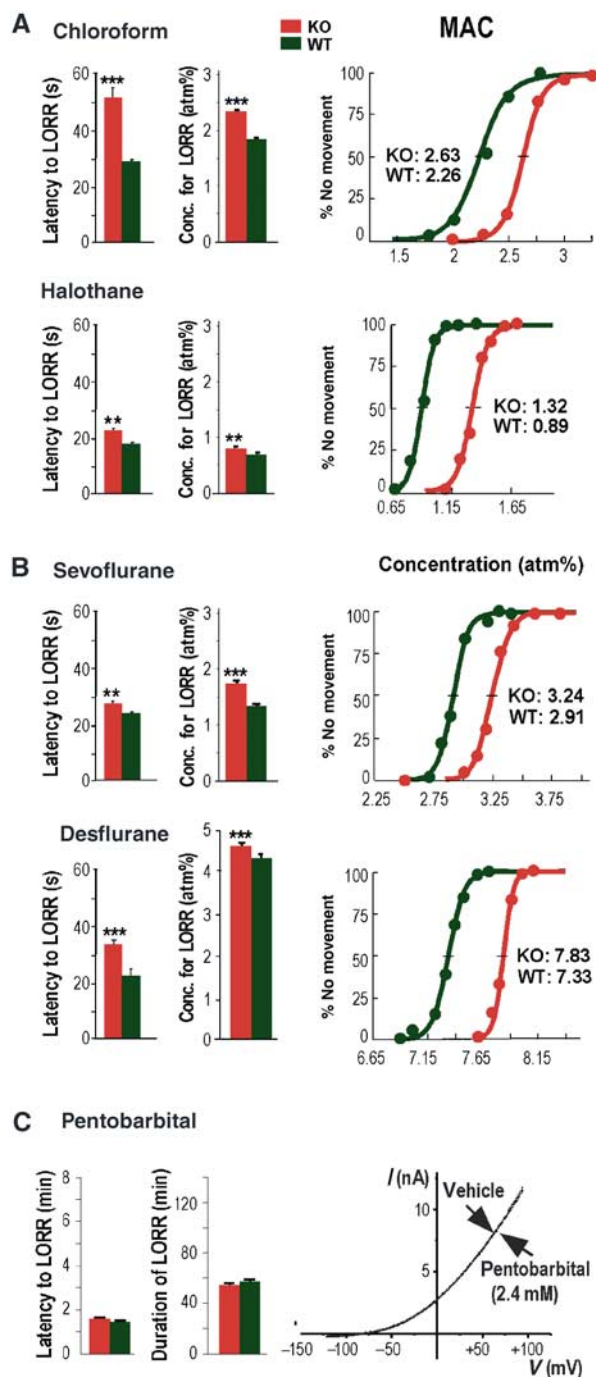


Figure 7 Effects of different anesthetics on LORR and MAC in $Trek1^{+/+}$ and $Trek1^{-/-}$ mice. LORR measurements after inhalation of volatile anesthetics. Latency to LORR is defined as the period of time (s) from inhalation to the LORR. Concentration for LORR corresponds to average concentrations of volatile anesthetics (A) chloroform and halothane and (B) sevoflurane and desflurane for the recovery from LORR. (C) LORR measurements (latency and duration of LORR expressed in minutes) after pentobarbital injection (30 mg/kg). Lack of effect of pentobarbital (2.4 mM) on TREK-1 channel expressed in transfected COS cells. *I-V* curves in steady-state control condition and after a 5 min application of pentobarbital (2.4 mM). *I-V* curve was elicited by a voltage ramp (1 s duration from -130 to $+100$ mV). Data represent mean \pm s.e.m. ($n = 20$ per genotype and anesthetic agent). Statistical significance (Student's *t*-test): ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$. Logistic regression probability of no movement fitted for volatile anesthetic concentrations. MAC and its 95% confidence interval (horizontal line) are shown on each graph.

protein both pre- and postsynaptically in the cortex and thalamic nuclei is consistent with a potential role for this channel in prevention of epileptic seizures. The high levels of TREK-1 expression in the hippocampus, a structure susceptible to damage during ischemia, and its modulation by neurotransmitter receptor activation are supplementary arguments for a major role of this channel in the control of excitotoxicity. Its activation in the neurons would be expected to hyperpolarize synaptic terminals, decreasing glutamate release and/or producing a postsynaptic hyperpolarization, which would favor the blockade of the NMDA receptor-associated channel by Mg^{2+} and also counterbalance glutamate-induced depolarization on other types of ionotropic glutamate receptors (Lauritzen *et al*, 2000). Without excluding a localization of the TREK-1 protein in glutamatergic neurons (Lauritzen *et al*, 2000), the TREK-1 channel has been described to be colocalized in GABAergic interneurons, specifically from striatum (this work), cerebellum, cortex and hippocampus (Hervieu *et al*, 2001). The phenotype of extreme vulnerability of TREK-1 null mutants against epilepsy and ischemia is consistent with the absence of TREK-1 channel in GABAergic interneurons, known to serve inhibitory functions in CNS and be involved in ischemic and epileptic disorders (Treiman, 2001; Wang, 2003). In the light of the role of TREK-1 channels in setting resting membrane potential, this is suggestive that TREK-1 may set the membrane potential of interneurons and thereby contribute to their often distinctive neurophysiological properties.

The beneficial effects of PUFAs on human health have long been advocated (Leaf and Kang, 1996; Nair *et al*, 1997; Leaf *et al*, 1999; Nordoy, 1999; Stoll *et al*, 1999) and indeed the effects of PUFAs on neuroprotection against epilepsy and ischemic paradigms in animals are spectacular (Lauritzen *et al*, 2000; Lang-Lazdunski *et al*, 2003). The results presented here strengthen the idea that neuroprotection induced by PUFAs (and LPLs) against seizures and ischemia is related to their action on the TREK-1 channel since this neuroprotection disappears in $Trek1^{-/-}$ mice and open the way for a novel neuroprotective strategy.

The possibility that a significant part of the effects of general anesthetics might result from potassium channel activation and especially K_{2P} channels has been previously suggested (Patel *et al*, 1999). This work definitively shows that the deletion of the TREK-1 gene induces a resistance to volatile anesthetics. This resistance is actually the greatest found for any ion channel knockout tested, including knockouts of GABA_A receptors (Campagna *et al*, 2003), also believed to be potential targets of volatile anesthetics. One might of course wonder why the deletion of TREK-1 does not completely abolish sensitivity to volatile anesthetics. An important reason is that volatile anesthetics such as halothane, desflurane and sevoflurane also activate other K_{2P} channels such as TREK-2 and TASK channels (Patel *et al*, 1999; Lesage *et al*, 2000), which are still expressed in the $Trek1^{-/-}$ mice. It will be important in the future to analyze multiple K_{2P} channel knockouts, which would then be expected to display extreme resistance to volatile anesthetics. Further experiments using selective Cre mice to abolish specifically the gene in a tissue or a cell type will also permit a more detailed analysis of the cellular mechanisms that underlie the behavioral responses.

Table II Respiratory rate (beats/min) of wild-type and TREK-1-deficient mice before the induction of anesthesia and at the MAC value

	Chloroform	Halothane	Isoflurane	Sevoflurane	Desflurane
Wild-type preanesthesia	152 ± 4	160 ± 1	159 ± 2	155 ± 3	163 ± 1
Wild-type MAC	166 ± 4	141 ± 2	84 ± 4	105 ± 3	106 ± 3
Knockout preanesthesia	154 ± 2	156 ± 2	161 ± 2	152 ± 3	160 ± 2
Knockout MAC	174 ± 3	148 ± 4	96 ± 5	116 ± 3	111 ± 3

Data were expressed as mean ± s.e.m. Statistical significance between wild-type and knockout mice was set at $P < 0.05$.

In conclusion, this work provides evidence for a major involvement of the TREK-1 channel in the control of the neuronal excitability and neuroprotective effects induced by PUFAs and LPLs against ischemia and epileptic seizures. TREK-1 appears to be an innovative target for the development of novel therapeutic neuroprotective strategies for brain pathologies.

Materials and methods

All experiments were conducted according to the policies on the care and use of laboratory animals of the Society of Neurosciences.

Generation of TREK-1-deficient mice

Trek-1 genomic clones were isolated from a 129 mouse genomic library by using a TREK-1 cDNA probe and subcloned into pBluescript SK (Stratagene). The floxed targeting vector was generated from a 7.5 kb *Bgl*III/*Eco*RI restriction fragment containing exons 1–3 of the KCNK2 gene. The vector was designed to allow CRE-mediated deletion of exon 3, which encodes the TM1 domain of the channel. The first loxp sequence was inserted in the 5' flanking intron of exon 3. Similarly, the PGK-neomycin resistance cassette (neo) was inserted together with a second loxp sequence in the 3' flanking intron of exon 3. Both loxp sequences were in the same orientation to allow CRE-mediated simultaneous excision of Exon 3 and neo cassette. A copy of the diphtheric toxin gene was subcloned adjacent to the homologous region for negative selection of the ES clone. The targeting vector (50 µg) was linearized prior to electroporation into 129-derived embryonic stem cells. After drug selection (G-418, 350 µg/ml), one positive clone (1/288) was identified by Southern blot and PCR analysis. Five highly chimeric males were generated by injection of the targeted ES cells into C57Bl/6J blastocysts. They were mated with C57Bl/6J females and germline transmission was assessed by Southern blot and PCR analysis of tail DNA from the agouti pups. TREK-1 floxed mice were then crossed with mice carrying the CRE recombinase gene under the control of the ubiquitous CMV promoter (D Metzger). Heterozygous TREK-1-deficient mice were then backcrossed with C57Bl/6J congenic mice over 11 generations. All animals (+/+ and –/–) were 8- to 10-week-old males of N6F2 to N11F2 backcross generation.

Kainate and pentylenetetrazol administration

After intraperitoneal injection of KA at 22 or 28 mg/kg, mice ($n = 20$ per group) were monitored for 2 h for onset and extent of seizures. Seizure severity was blindly scored (Tsirka *et al*, 1995). PTZ was injected similarly at 40 or 55 mg/kg and seizures were scored based on the highest degree of seizure within 15 min of the PTZ injection. The seizure index was calculated by averaging the points for seizure activity in each group ($n = 20$ per genotype and treatment). EEGs were recorded for 2 h on conscious mice ($n = 10$ per genotype and treatment) using four small platinum electrodes (diameter 0.28 mm) placed in the hippocampus (1.2 mm lateral, 1.6 mm posterior to the bregma, 1.6 mm inside) and in the anterior neocortex (2 mm lateral, 0.5 mm anterior to the bregma, 1.5 mm inside). The signals were amplified, digitized and quantified using the Galileo system (Sirius BB, Medical Equipment International).

Forebrain ischemia model (2 VO + hypotension)

Global ischemia ($n = 20$ per genotype and treatment) was induced by occluding both CCAs with aneurysm clips (Aesculap, Germany) during a 30 min episode of systemic hypotension induced by

withdrawal of blood to maintain an MABP of 30 ± 3 mmHg (Sheng *et al*, 1999).

Spinal cord ischemia model

Mice were subjected to crossclamping of the aortic arch, left subclavian artery and internal mammary artery for 10 min (Lang-Lazdunski *et al*, 2000). Motor function was blindly evaluated in the hind limbs using a rating scale of 0 (normal function) to 6 (total absence of movement) (Lang-Lazdunski *et al*, 2000).

Behavioral studies of sensitivity to anesthetic agents

Loss of righting reflex. Unrestrained mice ($n = 10$ per genotype and volatile anesthetic) were placed in a chamber maintained at 33–35°C. Carbon dioxide pressure (< 0.05 atm) and rectal temperature (36.5 ± 1.2 °C) were controlled. Each volatile anesthetic (chloroform, halothane, isoflurane, sevoflurane and desflurane) was administered with a calibrated vaporizer in 100% oxygen as the carrier gas with a fresh gas flow of 2 l/min at initial concentrations of 3.0, 1.2, 1.0, 1.8 and 5%, respectively. Concentrations of the volatile anesthetic were continuously measured by using a calibrated infrared analyzer (RGM 5250, Ohmeda, Louisville). After equilibration for 20 min at each initial anesthetic concentration, mice were blindly scored for LORR. The concentration of the anesthetics was then decreased in 10–20% increments and allowed to re-equilibrate at each concentration. Mice were observed continuously for recovery of the righting reflex. The concentration reported for LORR was calculated by averaging the two concentrations at which the mouse either retained or lost the righting reflex. Data were reported as mean ± s.e.m. Differences were evaluated using an unpaired *t*-test.

Tail-clamp/withdrawal assay. MAC was determined using the tail-clamp technique (Quasha *et al*, 1980). Mice ($n = 20$ per genotype and volatile agent) were first exposed for 20 min to a constant anesthetic concentration of almost 50% anesthetic induction values used in clinical practice. A hemostatic clamp was applied for 45 s to the midportion of the tail. Mice were scored blind for a motor withdrawal in response to clamping the tail. A mouse was considered to have moved if it made a purposeful muscular movement of the hind limb and/or the body. The anesthetic concentration was decreased in steps of 0.1% for each anesthetic, and the testing sequence was repeated after 20 min of exposure to each concentration. Concentration–response data were fitted to a logistic equation, yielding half-effect concentrations (median MAC values), slopes and estimates of their respective standard errors. Median MAC values were given with their respective 95% confidence interval limits. All *P*-values were two-tailed, and a *P*-value < 0.05 was considered significant.

Sleep time assay (i.e. duration of the LORR). Mice ($n = 20$ per genotype and anesthetic agent) were blindly tested for the duration of LORR (i.e. sleep time) in response to an intraperitoneal injection of pentobarbital (30 mg/kg). Mean sleep times for each agent were compared in null allele and wild-type mice using an unpaired *t*-test.

Onset of volatile and intravenous anesthetic action (i.e. latency to the LORR). Mice ($n = 10$ per genotype and anesthetic agent) were exposed to 8% chloroform, 4% halothane, 8% sevoflurane, 3% isoflurane or 10% desflurane in the same chamber used for LORR and tail-clamp assays. Onset of anesthetic action was defined as the time interval between the beginning of the anesthetic inhalation or the injection of the intravenous agent and the LORR.

Electrophysiology on COS cells

COS cells were seeded at a density of 20 000 cells per 35-mm dish 24 h before transfection. Cells were transiently transfected by the classical DEAE-dextran method with 0.1 µg pCI-mTREK-1 + 0.05 µg pCI-CD8. Transfected cells were visualized 48 h after transfection using anti-CD8 beads. The external solution contained (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ and 10 HEPES, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The pipette solution contained (in mM) 140 KCl, 4 MgCl₂, 5 EGTA and 10 HEPES (pH 7.2). The cell under study was continuously superfused with a microperfusion system (0.1 ml/min) at room temperature.

Electrophysiology on mouse striatal neurons

Primary culture of mouse striata was carried out according to Weiss *et al* (1986). Cells were plated in culture dishes previously coated with polyornithin and 50% fetal calf serum. Culture medium was DMEM plus glucose (1.5 g/l) for the first 24 h, then B27 plus uridine (2 µM) and 5-fluoro-2'-deoxyuridine (2 µM). Patch clamp measurements were performed 2 or 3 days after plating. In outside-out configuration, the internal solution contained (in mM) 155 KCl, 3 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES and 5 ATP-K⁺ (pH 7.2) and the external solution contained (in mM) 120 NaCl, 5 KCl, 3 MgCl₂, 1 CaCl₂, and 10 HEPES. We daily prepared and added to the external solutions 10 mM tetra-ethyl-ammonium chloride, 3 mM 4-aminopyridine, 10 µM glibenclamide and 5 mM glucose (pH at 7.4). TREK current anesthetic sensitivity was assessed in striatal neurons and in TREK-1-expressing COS cells (Patel *et al*, 1999).

DNA extraction

Tail biopsy was lysed with proteinase K (200 µg/ml) for 5–12 h at 56°C in buffer containing 100 mM Tris (pH 8.5), 200 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.2% SDS. Proteinase K was heat inactivated at 95°C for 5–10 min and the lysate was then either diluted in water for PCR amplification or centrifuged to get rid of undigested material prior to ethanol precipitation for subsequent digestion by restriction enzymes.

Southern blot

For Southern blotting, genomic DNA was digested overnight with the appropriate restriction enzyme, precipitated, size fractionated on a 0.6% agarose gel and transferred onto a nylon membrane in 0.4 M NaOH. ³²P-labelled probe hybridization was carried out overnight at 65°C in 0.5 M Na₂Pi/5% SDS, pH 6.8.

PCR analysis

PCR reactions were performed on 1 µl of a 20–30 times water dilution of the crude tail lysate in 15 µl final volume containing 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP and 0.2 µl *Taq* polymerase (Eurobio). Conditions were as follows: for TREK-1, 94°C/3 min > (94°C/20 s > 58°C/20 s > 72°C/35 s) × 33, oligos (see Figure 1) #1 (5'-GGT GCC AGG TAT GAA TAG AG3'), #2 (5'-TTC TGA GCA GAC TTG G3'), #3 (5'-GTG TGA CTG GGA ATA AGA GG3'); for TRAAK, 94°C/3 min > (94°C/30 s > 63.5°C/25 s > 72°C/35 s) × 35, primers #1 (5'-CCCTGCTCTTCTTCC3'), #2 (3'-ATTCTTCCTTCCCTTCC5'), #3 (5'-TGGACGAAGAGCATCAGGG3'), #4 (5'-GAGGAGCAGCCAATT TAGC3') (see Supplementary Figure 1).

In situ hybridization

Perfused brain sections were hybridized with specific oligonucleotide 3'-end-labelled probes (nucleotides 726–694 and 1536–1504 of the cloned mouse TREK-1; GenBank accession number U73488.2).

Immunohistochemistry

Immunostainings were performed on floating brain sections (50 µm) using the anti-rabbit α-TREK-1 (Lauritzen *et al*, 2000) and c-fos (Oncogene) rabbit polyclonal antibodies. Sections were floated in a solution of the primary antibody overnight at 4°C (1:200 dilution). Biotinylated secondary antibodies were amplified using a rabbit IgG Vector Elite ABC kit (Vector laboratories) with 3-diaminobenzidine as substrate.

TaqMan assays (real-time quantitative RT-PCR analysis)

Total RNA from the brain and cerebellum of *Trek1*^{-/-} and *Trek1*^{+/+} mice was isolated by using the Trizol method (Invitrogen). Reverse transcription was performed with 2 µg of total RNAs, treated for 30 min with RQ1 DNase I (Promega) and reverse-transcribed with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR analysis (SYBR Green Mastermix Plus, Eurogentec) was performed to estimate the level of expression of TREK-1, TREK-2, TRAAK, TASK-1, TASK3, TWIK-1 and GABAα6 subunit in the brain and cerebellum of *Trek1*^{-/-} and *Trek1*^{+/+} mice. Primers for the seven different amplicons were as follows:

TREK-1 forward TTTTCTGCTGGTGGTCGCTCTC;
TREK-1 reverse GCTGCTCCAATGCCTTGAAC;
TREK-2 forward CCGGAATTACTCTCTGGATGAAGA;
TREK-2 reverse CATGGCTGTGCTGGAGTTGT;
TRAAK forward CCCAGTGAGAATCTGGCC;
TRAAK reverse GGGCACAGCCACGCTC;
TASK-1 forward CGGCTTCCGCAACGCTCTAT;
TASK-1 reverse TTGTACCAGAGGCACGAGCA;
TASK-3 forward GACGCCCTCGAGTCGGACCA;
TASK-3 reverse CTCTGAGACGGACTTCTCTC;
TWIK-1 forward TGTCCTTCTCTCCGTCCTG;
TWIK-1 reverse AGGCCACAAAAGGCTCATTCT;
GABAα6 forward CGCCCCCTGTGGCAA;
GABAα6 reverse TACTTGGAGTCAGAATGCACAACA;
CYCLOPHILIN forward GGCTCTTGAAATGGACCCTTC;
CYCLOPHILIN reverse GACCAATGCTGATCATATCTCT.

Real-time PCR assays for each gene target were performed on cDNA samples in 96-well plates on an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems). PCR data were captured using Sequence Detector Software. Data were analyzed using the comparative CT method where the amount of target was normalized to an endogenous reference (cyclophilin D) and calibrated to the amount of target in wild-type mice (User Bulletin No. 2 Applied Biosystems). Experiments were performed in triplicate. Standard curves were generated for each set of primers using serial dilutions of mouse brain cDNA to ensure a high efficiency of amplification.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Paul Hamel Institute. We are grateful to the Fondation de la Recherche Médicale and the Association Française contre les Myopathies for fellowships to M Mazzuca and C Laigle and to the Ministère de la Recherche et de la Technologie (ACI 'Biologie du développement & physiologie intégrative'). We thank Dr J Barhanin and Dr E Honoré for fruitful discussions and Dr L Rash for a critical reading of the manuscript. We thank G Jarretou for his remarkable help in histological analysis, M Jodar for expert work in neuronal cultures and F Aguila and V Briet for their skillful technical assistance.

References

- Blondeau N, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C (2002) A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**: 821–834
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C (2001) Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* **109**: 231–241
- Bockaert J, Pin J, Fagni L (1993) Metabotropic glutamate receptors: an original family of G protein-coupled receptors. *Fund Clin Pharmacol* **7**: 473–485
- Bordi F, Ugolini A (1999) Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* **59**: 55–79
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a

- voltage-independent potassium conductance. *Nature* **409**: 88–92
- Campagna JA, Miller KW, Forman SA (2003) Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* **348**: 2110–2124
- Chemin J, Girard C, Duprat F, Lesage F, Romey G, Lazdunski M (2003) Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J* **22**: 1–9
- Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M (2000) The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* **57**: 906–912
- Ettaiche M, Fillacier K, Widman C, Heurteaux C, Lazdunski M (1999) Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 729–736
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* **23**: 80–88
- Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J* **15**: 6854–6862
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acid. *EMBO J* **17**: 3297–3308
- Gasparini F, Kuhn R, Pin JP (2002) Allosteric modulators of group I metabotropic glutamate receptors: novel subtype-selective ligands and therapeutic perspectives. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 43–49
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Gray CW, Green PJ, Ranson JL, Randall AD, Meadows HJ (2001) Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* **103**: 899–919
- Jan LY, Jan YN (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* **20**: 91–123
- Kim D, Sladek CD, Aguado-Velasco C, Mathiasen JR (1995) Arachidonic acid activation of a new family of K⁺ channels in cultured rat neuronal cells. *J Physiol* **484**: 643–660
- Kita H, Kitai ST (1988) Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res* **447**: 346–352
- Kouchoukos NT, Dougenis D (1997) Surgery of the thoracic aorta. *N Engl J Med* **336**: 1876–1888
- Kurachi Y, Jan LY, Lazdunski M (1999) Potassium ion channels. Molecular structure, function, and diseases. In *Current Topics in Membranes*, Kurachi Y, Jan LY, Lazdunski M (eds) Vol. 46. San Diego, CA: Academic Press
- Lang-Lazdunski L, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M, Heurteaux C (2003) Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. *J Vasc Surg* **38**: 564–575
- Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Vaillant C, Widman C, Lazdunski M (1999) Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. *J Thorac Cardiovasc Surg* **117**: 881–889
- Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel JP, Moskowitz MA, Dietrich WD (2000) Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse. *Stroke* **31**: 208–213
- Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* **19**: 1784–1793
- Leaf A, Kang JX (1996) Prevention of cardiac sudden death by N-3 fatty acids: a review of the evidence. *J Intern Med* **240**: 5–12
- Leaf A, Kang JX, Xiao Y-F, Billman GE, Voskuyl RA (1999) The antiarrhythmic and anticonvulsant effects of dietary N-3 fatty acids. *J Membr Biol* **172**: 1–11
- Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* **44**: 1–7
- Lesage F, Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two pore domain potassium channels. *Am J Physiol* **279**: 793–801
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **275**: 28398–28405
- Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (1999a) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem* **274**: 1381–1387
- Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000a) TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J* **19**: 2483–2491
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (1999b) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* **274**: 26691–26696
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000b) Lysophospholipids open the two P domain mechano-gated K⁺ channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* **275**: 10128–10133
- Nair SS, Leitch JW, Falconer J, Garg ML (1997) Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J Nutr* **127**: 383–393
- Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* **19**: 267–271
- Nordoy A (1999) Dietary fatty acids and coronary heart disease. *Lipids* **34**: S19–S22
- Patel AJ, Honoré E (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* **24**: 339–346
- Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* **2**: 422–426
- Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-type K⁺ channel. *EMBO J* **17**: 4283–4290
- Pongs O (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett* **452**: 31–35
- Pratt J, Rataud J, Bardot F, Roux M, Blanchard JC, Laduron PM, Stutzmann JM (1992) Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett* **140**: 225–230
- Quasha AL, Eger EI, Tinker JH (1980) Determination and applications of MAC. *Anesthesiology* **53**: 315–334
- Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, Pak MD, Wei A (1992) An essential ‘set’ of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci* **15**: 161–166
- Sheng H, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Warner DS (1999) Characterization of a recovery global cerebral ischemia model in the mouse. *J Neurosci Methods* **88**: 103–109
- Siegelbaum SA, Camardo JS, Kandel ER (1982) Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in Aplysia sensory neurones. *Nature* **299**: 413–417
- Smeyne RJ, Schilling K, Robertson L, Luk D, Oberdick J, Curran T, Morgan JI (1992) fos-lacZ transgenic mice: mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* **8**: 13–23
- Stoll AL, Severus E, Freeman MP, Rueter S, Zboyan HA, Diamond E, Gress KK, Marangell LB (1999) Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* **56**: 413–416
- Talley EM, Sirois JE, Lei Q, Bayliss DA (2003) Two-pore-domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist* **9**: 46–56
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA (2001) CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* **21**: 7491–7505
- Treiman DM (2001) GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* **42**: 8–12
- Tsirk SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**: 340–344
- Wang J (2003) Short-term cerebral ischemia causes the dysfunction of interneurons and more excitation of pyramidal neurons in rats. *Brain Res Bull* **60**: 53–58
- Wei A, Jegla T, Salkoff L (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**: 805–829
- Weiss S, Pin JP, Sebben M, Kemp DE, Sladeczek F, Gabrion J, Bockaert J (1986) Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2238–2242
- Yamakura T, Bertaccini E, Trudell JR, Harris RA (2001) Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 23–51

**7.2 Canaux potassiques, maladies héréditaires et acquises (La
Revue de Médecine Interne-2007)**

Lexique

Canaux potassiques, maladies héréditaires et acquises

Potassium channels, genetic and acquired diseases

M. Mazzuca^{a,b}, F. Lesage^{a,c,*}

^a Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, centre national de la recherche scientifique, Sophia-Antipolis, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

^b Service de pédiatrie, centre hospitalier Princesse-Grace, avenue Pasteur, 98000 Principauté de Monaco, France

^c Unité de neurologie, hôpital Pasteur, centre hospitalo-universitaire de Nice, 30, avenue de la Voie-Romaine, BP 69, 06002 Nice cedex 01, France

Reçu le 29 janvier 2007 ; accepté le 10 avril 2007

Disponible sur internet le 15 mai 2007

Résumé

Introduction. – Les canaux K^+ permettent le passage passif et sélectif des ions K^+ au travers des membranes. Ils jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du K^+ , dans le contrôle de l'excitabilité neuronale et musculaire et dans la sécrétion des neurotransmetteurs et des hormones.

Exégèse. – Les canaux K^+ sont des complexes protéiques associant sous-unités membranaires formant le pore ionique et sous-unités régulatrices. Il existe une grande diversité structurale et fonctionnelle de ces canaux.

Conclusion. – Cette diversité est soulignée par le nombre croissant de maladies génétiques ou acquises associées à des dysfonctionnements de ces canaux.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Introduction. – K^+ channels allow the passive and selective transport of K^+ ions through the membranes. They control K^+ homeostasis, neuronal and muscular excitabilities, and neurotransmitter and hormone release.

Exegesis. – K^+ channels are composed of pore-forming subunits associated with regulatory subunits. Many different K^+ channels have been identified.

Conclusion. – This diversity is stressed by the growing number of genetic and acquired diseases associated with these channels.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Canaux ioniques ; Canalopathies ; Mutations ; Maladies auto-immunes

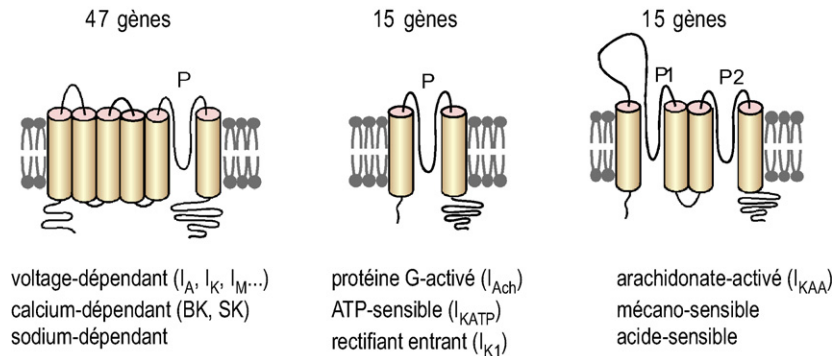
Keywords: Ion channels; Channelopathies; Mutations; Auto-immune diseases

Dans la majorité des situations physiologiques, la concentration en ions K^+ est plus élevée dans les cellules que dans le milieu extracellulaire. L'ouverture des canaux sélectifs au K^+ se traduit par un flux sortant d'ions K^+ vers l'extérieur de la cellule, et par une augmentation du potentiel électrique transmembranaire. Les canaux K^+ sont donc importants pour le contrôle de l'homéostasie du potassium et la régulation du volume cellulaire, mais ils interviennent aussi dans l'ensemble des processus physiologiques qui requièrent des variations de potentiel transmembranaire : excitabilité neuronale et musculaire, contrôle du rythme cardiaque, sécrétions des hormones

et des neurotransmetteurs, cycle cellulaire, fonctions sensorielles, etc. Les canaux K^+ sont des complexes protéiques polymériques composés de sous-unités membranaires formant le pore ionique et de sous-unités auxiliaires. Cet ensemble peut interagir lui-même avec des protéines de régulation (kinases, phosphatases, protéines G), de transport (protéines vésiculaires), d'adressage, d'échafaudage et du cytosquelette. La nature de ces protéines et de leurs interactions détermine les propriétés électrophysiologiques et la distribution subcellulaire de l'unité fonctionnelle ainsi formée. L'étude des canaux ioniques dans leur environnement natif par la technique du patch-clamp a révélé l'existence d'une grande diversité de courants K^+ aux propriétés fonctionnelles et pharmacologiques distinctes. Cette diversité fonctionnelle repose d'abord sur une grande diversité

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : lesage@ipmc.cnrs.fr (F. Lesage).

Fig. 1. Les différentes classes de canaux K^+ .

Les différentes sous-unités principales sont réparties en trois grandes classes selon le nombre de segments transmembranaires (STM) et de domaine pore (P), une séquence fortement conservée qui intervient dans la formation du filtre de sélectivité du pore ionique. Les extrémités amino- et carboxyterminale sont intracellulaires. Les canaux K^+ sont des homo- ou des tétramères de sous-unités à six et deux STM, et des dimères de sous-unités à quatre STM. Une sous-unité non représentée ici mais proche de la famille des 6STM/1P possède un STM additionnel et une extrémité aminoterminal extracellulaire.

génique. Dans le génome humain, plus de 77 gènes codant des sous-unités principales ont été identifiés, dont une grande majorité est exprimée dans le système nerveux. Les canaux sont répartis en trois grandes classes selon leurs homologies structurales et leurs propriétés électrophysiologiques (Fig. 1). Le rôle majeur des canaux K^+ est souligné par le nombre croissant de maladies génétiques ou acquises impliquant ces protéines. Cette revue présente un état rapide des connaissances sur ces maladies et sur leurs bases moléculaires (Tableau 1).

1. Maladies génétiques et canaux K^+

1.1. Syndromes cardiaques du QT long (LQT), arythmies et surdités

Les canaux formés des sous-unités KCNH2/KCNE2 et KCNQ1/KCNE1 sont responsables des courants cardiaques I_{Kr} et I_{Ks} . Chez l'Homme, des mutations dans les quatre gènes correspondants sont associées à des repolarisations ven-

Tableau 1
Maladies associées aux canaux K^+

Maladie	Gène (localisation chromosomique)	Protéine/cible antigénique	Courant potassique	Physiopathologie	Référence bibliographique
Arythmies cardiaques (LQT2, RW sd)	<i>KCNH2</i> (7q35-36)	Herg	Voltage-dépendant (I_{Kr})	Perte de fonction	[1]
Arythmies cardiaques (LQT1, RW sd, fibrillation auriculaire)	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)	KCNQ1 (KvLQT1)	Voltage-dépendant (I_{Ks})	Perte de fonction ou gain de fonction	[2,3]
Arythmies cardiaques et surdité (LQT1, JLN sd)	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)	KCNQ1 (KvLQT1)	Voltage-dépendant (I_{Ks})	Perte de fonction	[4]
Arythmies cardiaques et surdité (LQT5, JLN sd)	<i>KCNE1</i> (21q22.1)	IsK	Voltage-dépendant (I_{Ks}) sous-unité régulatrice	Perte de fonction	[5]
Arythmies cardiaques, fibrillation auriculaire	<i>KCNE2</i> (21q22.1)	MiRP1	Voltage-dépendant (I_{Kr}) sous-unité régulatrice	Perte de fonction ou gain de fonction	[6]
Surdité dominante (DFNA2)	<i>KCNQ4</i> (1p34)	KCNQ4	Voltage-dépendant	Perte de fonction	[7]
Convulsion néonatale bénigne familiale 1	<i>KCNQ2</i> (20q13.3)	KCNQ2	Voltage-dépendant (I_{KM})	Perte de fonction	[8]
Convulsion néonatale bénigne familiale 2	<i>KCNQ3</i> (8q24)	KCNQ3	Voltage-dépendant (I_{KM})	Perte de fonction	[9]
Ataxie épisodique type 1	<i>KCNA1</i> (12p13)	Kv1.1	Voltage-dépendant	Perte de fonction	[10]
Syndrome d'Andersen (LQT7)	<i>KCNJ2</i> (17q23)	Kir2.1	Rectifiant entrant	Perte de fonction	[11]
Hyperinsulinémie infantile	<i>KCNJ11</i> (11p15.1)	Kir6.2	ATP-sensible (I_{KATP})	Perte de fonction	[12]
Hyperinsulinémie infantile	<i>SUR1</i> (11p15.1)	SUR1	ATP-sensible (récepteur aux sulfonylurées, sous unité I_{KATP})	Perte de fonction	[13]
Diabète néonatal	<i>KCNJ11</i> (11p15.1)	Kir6.2	ATP-sensible	Gain de fonction	[14]
Alcalose hypokaliémique (syndrome de Bartter)	<i>KCNJ1</i> (11q24)	ROMK1 (Kir1.1)	Rectifiant entrant	Perte de fonction	[15]
Neuromyotonie acquise (syndrome d'Isaacs)	—	<i>Kv1.1</i> , <i>Kv1.4</i> , <i>Kv1.6</i>	Voltage-dépendant	Internalisation/IgG	[16]
Syndrome de Morvan	—	<i>Kv1.1</i> , <i>Kv1.4</i> , <i>Kv1.6</i>	Voltage-dépendant	Internalisation/IgG	[17]
Encéphalite limbique	—	<i>Kv1.1</i> , <i>Kv1.4</i> , <i>Kv1.6</i>	Voltage-dépendant	Internalisation/IgG	[18]

JLN sd : syndrome de Jervell-Lange-Nielsen ; RW sd : syndrome de Romano-Ward.

triculaires anormalement longues (QT long) et à des arythmies pouvant être fatales. Des mutations silencieuses dans *KCNH2* et *KCNQ1* sont des facteurs de prédisposition aux LQT révélés par la prise de certains antiarythmiques qui bloquent les courants I_{Kr} . De rares fibrillations auriculaires congénitales sont initiées et maintenues par des mutations gain de fonction de *KCNQ1* et de *KCNE2*. Par ailleurs, des mutations de *KCNQ1* et *KCNE1* sont impliquées dans un syndrome cardioauditif congénital, le syndrome de Jervell–Lange–Nielsen (JLN). Les mutations de *KCNQ4* sont associées à la surdité congénitale de type 2 (DFNA2). Comme dans le cas du syndrome de JLN, les courants K^+ produits impliqués interviennent dans l'homéostasie potassique de l'endolymph.

1.2. Hyperexcitabilité neuronale et dégénérescence

Des mutations perte de fonction des gènes codant *KCNQ2* et *KCNQ3* provoquent une épilepsie bénigne du nourrisson dominante. Ce syndrome semble survenir après une période dont la durée ne dépend pas du terme de la gestation soulignant le rôle physiologique de ces canaux lors de la maturation cérébrale. De plus, un nouvel antiépileptique, la rétigabine, en phase III d'essai thérapeutique, a été initialement choisi pour son action inductrice des courants K^+ produits par ces canaux (I_{KM}). L'ataxie épisodique avec myokymie représente une autre maladie neurologique. Elle est liée à des mutations dans le canal $Kv1.1$ (*KCNA1*). Finalement, un premier cas d'épilepsie pharmacorésistante du lobe temporal a été associé à une troncation de la sous-unité $Kv4.2$, responsable d'une réduction du courant voltage-dépendant I_A ce qui conduit à une hyperexcitabilité neuronale.

1.3. Syndrome d'Andersen

Le syndrome d'Andersen, décrit pour la première fois en 1971, associe des faiblesses musculaires régressives mais récidivantes (ou des paralysies musculaires) à une arythmie ventriculaire chronique, un allongement de l'intervalle QT et un risque de syncope et de mort subite. Cette affection s'accompagne d'un syndrome dysmorphique : hypoplasie mandibulaire avec rétrognathisme, oreilles implantées bas, palais ogival et clinodactylie. Les mutations de *KCNJ2* responsables de ce syndrome ont une pénétrance variable et entraînent une perte de fonction à effet dominant négatif.

1.4. Hyperinsulinémie hypoglycémiant

Dans les cellules β du pancréas, les canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP}) sont impliqués dans la sécrétion d'insuline. Lorsque le ratio ATP/ADP intracellulaire augmente en période postprandiale, les canaux K_{ATP} se ferment, ce qui entraîne une dépolarisation, une entrée de Ca^{2+} et l'exocytose de l'insuline. Des mutations perte de fonction dans les gènes codant les constituants de ces canaux (sous-unité $Kir6.2$ [*KCNJ11*] et récepteur aux sulfonylurées 1 [*SURI*]) produisent une hyperinsulinémie néonatale persistante associée à une hypoglycémie sévère.

1.5. Diabète insulino-dépendant

D'autres mutations n'affectent pas directement l'expression des canaux K_{ATP} , mais leur régulation par l'ATP. Une augmentation de la sensibilité du canal à l'ATP induit un hyperinsulinisme, alors qu'une perte de sensibilité est responsable d'un syndrome de résistance à l'hyperglycémie et donc d'un diabète. Certaines mutations de $Kir6.2$ associées une perte d'affinité pour l'ATP sont également responsables de syndromes de WEST pharmacorésistants avec dysmorphie faciale. Bahi-Buisson et al. ont suggéré un traitement de cette épilepsie par les sulfonylurées, qui bloquent les K_{ATP} afin de compenser leur activité excessive.

1.6. Syndrome rénal de Bartter

Au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé, la réabsorption du Na^+ par le cotransporteur Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ est dépendante de la sécrétion de K^+ par canal $Kir1.1$ (gène *KCNJ1*). Des mutations de *KCNJ1* sont impliquées dans le syndrome de Bartter qui associe perte de $NaCl$, alcalose hypokaliémique et hypotension artérielle.

2. Maladies auto-immunes et canaux K^+

Les maladies auto-immunes les mieux décrites faisant intervenir des anticorps dirigés contre des canaux ioniques sont la myasthénie auto-immune (récepteur à l'acétylcholine) et le syndrome de Lambert-Eaton (canaux Ca^{2+} voltage-dépendants). Des anticorps dirigés contre certaines sous-unités de la famille des canaux K^+ voltage-dépendants ont été également décrits dans des troubles neurologiques. Ces auto-anticorps peuvent être associés à une neuromyotonie acquise, initialement décrite par Isaacs, mais aussi à des encéphalites limbiques et au syndrome de Morvan. Que les symptômes soient centraux ou périphériques, les anticorps en se fixant sur ces canaux n'induisent pas directement de perte de fonction, mais conduisent à une hyperexcitabilité neuronale par augmentation de leur internalisation. Les traitements immunomodulateurs ou les plasmaphères semblent efficaces.

2.1. Syndrome d'Isaacs

La neuromyotonie acquise est observée chez des patients de 25 à 60 ans et associe une hyperexcitabilité musculaire spontanée avec rigidité, crampes, fasciculations (myokymies), une pseudomyotonie (relaxation lente après contraction) et une faiblesse musculaire prédominant au niveau des membres et du tronc. Une hyperhydrose est fréquente. Ces symptômes peuvent s'associer à ceux d'autres pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé ou encore le diabète insulino-dépendant. Des neuromyotonies acquises peuvent constituer un syndrome paranéoplasique dans le cadre de thymomes (10–20 %), plus rarement de cancer du poumon à petites cellules ou de lymphome de Hodgkin. La reconnaissance de l'auto-immunité dans la neuromyotonie vient de l'observation d'anomalies du liquide cérébrospinal chez des patients présentant des tumeurs, thymome

en particulier. L'injection de plasma de patients à des souris entraîne une hyperexcitabilité neuromusculaire. On observe aussi une hyperexcitabilité des neurones de ganglions spinaux cultivés en présence d'IgG de patients neuromyotoniques. Ces effets sont similaires à ceux obtenus par le blocage pharmacologique des canaux K^+ voltage-dépendants. Des autoanticorps, de type IgG mais aussi IgM, dirigés contre les canaux Kv1.1, Kv1.2 et Kv1.6 ont été identifiés chez ces patients.

2.2. Syndrome de Morvan

En plus des troubles décrits dans le cadre de la myopathie d'Isaacs, certains patients présentent des troubles neurosensoriels et des signes centraux de type troubles du sommeil, hallucinations et troubles de la personnalité. Lorsque ces symptômes sont sévères et qu'ils sont associés à une dysautonomie, arythmie cardiaque, constipation, hypersialorrhée et hyperhydrose, le tableau clinique correspond au syndrome décrit en 1890 par Morvan.

2.3. Encéphalite limbique

Il s'agit d'une maladie auto-immune, non paranéoplasique, affectant exclusivement le système nerveux central. Les patients présentent de manière aiguë ou subaiguë des troubles mnésiques et une confusion, associés à une épilepsie du lobe temporal pharmacorésistante, responsable le plus souvent de crises pilomotrices simples ou complexes. Les troubles cognitifs et les troubles de la mémoire antéro- et rétrograde peuvent être profonds. Sur le plan morphologique, les patients présentent des hypersignaux IRM au niveau des régions temporales internes. Sans traitement efficace, cette encéphalite limbique conduit au développement d'une atrophie hippocampique. La réponse aux traitements immunosuppresseurs comprend une amélioration des performances cognitives et mnésiques. Ces patients présentent des titres élevés d'anticorps dirigés contre les sous-unités Kv1.1, Kv1.2 et Kv1.6 qui est particulièrement exprimée dans l'hippocampe.

3. Conclusion

Les maladies associées aux canaux K^+ , qu'elles soient acquises ou génétiques, sont de nature très variée : il s'agit de neuropathies, de myopathies, de cardiopathies, de maladies endocriniennes et du système sensoriel. Cette étonnante diversité souligne bien le caractère central joué par les canaux K^+ dans nombre de fonctions physiologiques essentielles. Cela révèle aussi l'intérêt que constituent ces canaux en termes de cibles potentielles pour le développement de nouveaux médicaments, en plus des antidiabétiques (sulfonylurées) et des antiarythmiques existants déjà. Finalement, il faut noter qu'aucune maladie n'a pour l'instant été associée aux canaux K^+ à deux domaines P. Leur implication récente dans le contrôle de l'excitabilité neuronale doit cependant nous inciter

à considérer ces canaux comme des candidats de choix pour des maladies du système nerveux qu'il nous faut encore identifier.

Références

- [1] Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;80:795–803.
- [2] Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996;12:17–23.
- [3] Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, et al. *KCNQ1* gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003;299:251–4.
- [4] Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene *KVLQT1* causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 1997;15:186–9.
- [5] Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, et al. IsK and KVLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet* 1997;6:2179–85.
- [6] Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;97:175–87.
- [7] Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999;96:437–46.
- [8] Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al. A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 1998;18:25–9.
- [9] Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 1998;18:53–5.
- [10] Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, et al. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *KCNAL1*. *Nat Genet* 1994;8:136–40.
- [11] Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001;105:511–9.
- [12] Thomas P, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet* 1996;11:1809–12.
- [13] Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, et al. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995;268:426–9.
- [14] Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:1838–49.
- [15] Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, et al. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K^+ channel, ROMK. *Nat Genet* 1996;14:152–6.
- [16] Arimura K, Sonoda Y, Watanabe O, Nagado T, Kurono A, Tomimitsu H, et al. Isaacs' syndrome as a potassium channelopathy of the nerve. *Muscle Nerve* 2002(Suppl 11):S55–8.
- [17] Barber PA, Anderson NE, Vincent A. Morvan's syndrome associated with voltage-gated K^+ channel antibodies. *Neurology* 2000;54:771–2.
- [18] Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K^+ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain* 2006;129(Pt 6):1570–84.

7.3 Ion channels and epilepsy (Epileptic Disorders-2006)

Ion channels and epilepsy

Michel Mazzuca^{1,2}, Florian Lesage^{1,3}, Michel Lazdunski¹

¹ Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 6097, Valbonne

² Unité de Neuropédiatrie, Hôpital l'Archet II, Centre Hospitalo-Universitaire de Nice

³ Service de Neurologie, Hôpital Pasteur, Centre hospitalo-universitaire de Nice, France

ABSTRACT – Ion channels play a central role in the generation and control of neuronal excitability. Genetic defects in ion channels are associated with several forms of human idiopathic epilepsies. These defects range from non-sense and missense point mutations to insertion, truncation and splice site mutations producing altered, non-functional or negative-dominant channel subunits. To date, 12 mutated genes have been identified. They code for Na⁺ (*SNC1A*, *SNC2A*, *SNC1B*), K⁺ (*KCNA1*, *KCNQ2*, *KCNQ3*) and Cl⁻ (*CLCN2*) channel subunits, as well as neurotransmitter receptor subunits including Cl⁻ channel GABAA receptor (*GABRA1*, *GABRG2*) and cationic channel acetylcholine receptor (*CHRNA4*, *CHRNA2*). One ion transporter Na⁺/K⁺ ATPase gene (*ATP1A2*) has also been identified. The epilepsy syndromes related to these genes are as diverse as benign familial neonatal (BFNC - *KCNQ2* and *3*) and infantile (BFNIC - *SNC2A* and *ATP1A2*) convulsions, episodic ataxia with seizures (AE2 - *KCNA1*), generalized epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+ - *SCN2A*, *1A*, *1B* and *GABRG2*), autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE - *CHRNA4* and *B2*), severe myoclonic epilepsy of infancy (SMEI - *SNC1A*), juvenile myoclonic epilepsy (JME - *GABRA1* and *CLCN2*), and childhood and juvenile absence epilepsy (CAE, JAE - *SNC1B*, *GABRG2* and *CLCN2*). Despite the difficulty to correlate genotypes and phenotypes, these studies have increased our understanding of causal mechanisms of epilepsy and open a wide range of possibilities for developing better antiepileptic drugs and treatments.

Keywords: ion channels, epilepsy, epilepsy genetics

Epilepsy is a commonly occurring chronic disease affecting at least 1% of the world population. The international classification of epileptic syndromes identifies idiopathic, symptomatic and cryptogenic epilepsies. The main etiological factor related to idiopathic epilepsy is genetic predisposition, either confirmed or suspected (Baraister, 1990).

To date, mendelian transmission of some rare forms of idiopathic epilepsy has been demonstrated by studies of large families in which many family members suffer from epilepsy. Studies of twins also argue for a genetic origin in idiopathic epilepsies (Berkovic *et al.*, 1998, Corey *et al.*, 1991, Harvold and Hauge 1965, Inouye, 1960, Lennox and Lennox 1960, Sillanpaa *et al.*, 1991). However, most idiopathic epi-

lepsies are genetic disorders showing complex mendelian transmission (Kaneko and Wada 1998), which suggests simultaneous involvement of several genes. The diversity of these "susceptible" genes is likely to play a role in determining relative risk (Delgado-Escueta *et al.*, 1994).

In basic terms, an epileptic seizure can be caused by three types of factors: impaired inhibition, excess of excitation, or faulty regulation of the membrane resting potential. Therefore, ion channels expressed in the central nervous system (CNS) are ideal candidates for the study of mutational polymorphisms in a given patient population. Propagation of electrical impulses in the neurons is initiated by the opening of voltage-gated sodium channels, which allows sodium ion

Correspondence:

M. Mazzuca
660, route des Lucioles,
06560 Valbonne,
France

Table 1. Genetic mutations responsible for various forms of idiopathic epilepsy.

	Subunit	Gene	Locus	Mutations	Epileptic syndrome
Inhibitory currents					
Potassium channel	KCNQ2	KCNQ2	20q13	missense, truncation	BFNC (myokymia, FC+, CTE, GIE)
	KCNQ3	KCNQ3	8q24	missense	BFNC
	Kv1.1	KCNA1	12p13	missense	Type 1 episodic ataxia and partial idiopathic seizures
Chloride channel	CLC-2	CLCN2	3q26	missense, truncation, splicing	Childhood and juvenile absence epilepsy (CAE, JAE) juvenile myoclonic epilepsy, matitutinal grand mal epilepsy
GABA A receptor (chloride channel)	α 1	GABRA1	5q34	missense	myoclonic epilepsy
	γ 2	GABRG2	5q34	missense, truncation	GEFS+, JAE
Excitatory currents					
Sodium channel	α 1	CNS1A	2q24	missense, nonsense, truncation, splicing (skipped phase)	GEFS+, Dravet
	α 2	CNS2A	2q24	missense	GEFS+, BFNC
	β 2	CNS1B	19q13	missense	GEFS+, JAE
Acetylcholine receptor (cationic channel)	α 4	CHRNA4	20q13	missense, insertion	ADNFLE
	β 2	CHRNA2	1p21	missense	ADNFLE
Ion transporter					
Na/k ATPase (active transporter)	α 2	ATP1A2	1q21	missense	BFIC

FC+: febrile convulsions +; BFIC: benign familial infantile convulsions; BFNC: benign familial neonatal convulsions; CTE: centrotemporal epilepsy; ADNFLE: autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy; GEFS: generalized epilepsy with febrile seizures; GIE: generalized idiopathic epilepsy; Dravet: severe myoclonic epilepsy of infancy.

influx (Na^+) along their concentration gradient. Action potential ends upon simultaneous activation of voltage-gated potassium channels, followed by potassium ion (K^+) outflow, which restores cell membrane resting potential. Voltage-gated calcium channels at axonal endings allow the conversion of electrical signals to chemical signals thanks to the input of calcium ions (Ca^{2+}) which induce the release of neurotransmitters of synaptic vesicles. These neurotransmitters, such as acetylcholine, GABA or glutamate, subsequently stimulate postsynaptic channel receptors. Fixation of these ligands on their receptors generates a new action potential. Mutations in 12 genes encoding channels and channel receptors are responsible for various forms of idiopathic epilepsy (table 1). These mutations and their connection with epilepsy are the subject of this review.

Acetylcholine receptors, Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy, Paroxysmal Rolandic Epilepsy

Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE)

This epilepsy is characterized by short seizures occurring during slow sleep (stage 2). Syndrome diagnosis is often

made late in the course of the disorders, following diagnostic speculations all the way from paroxysmal nocturnal dyskinesia to hysteria, and including sleep problems such as night terrors and nightmares (Scheffer *et al.*, 1994).

ADNFLE is an autosomal dominant condition with relatively high penetrance (70-80%) (Scheffer *et al.*, 1995, Picard *et al.*, 2000). Great individual variations in the presentation of the disease have been described within the same family in terms of age at onset and severity of symptoms. In most patients, the first seizures appear in the first or second decade of life. Seizures can start as tremors, grunts or vocalizations, and are sometimes preceded by an aura. Secondary generalization is only seen in rare cases. Focal seizures seen in this epilepsy are those which affect motor activity: disorganized hyperkinetic activity or tonic symptoms, sometimes with added clonic manifestations. Intervals of several years without seizures have been reported. Interictal EEG findings tend to be of little help. Therefore, nocturnal polysomnographic video EEG recordings are useful for confirming the diagnosis.

In the last ten years, important discoveries have made it possible to genetically distinguish three types of ADNFLEs. In the case of type 1 ADNFLE, the study of several families made it possible to describe mutations of the gene encod-

ing the $\alpha 4$ subunit of the neuronal acetylcholine receptor CHRNA4.

These are point mutations by insertion or by transposition in exon 5 of the gene located on chromosome 20 (20q13.2-q13-3) causing point mutations in the second transmembrane domain (M2) (Phillips *et al.*, 1995). The first mutation found in familial epilepsy was discovered in an Australian family, and consists of the transposition of a cytosine into thymidine. This transposition results in the replacement of a serine, a neutral amino acid, by a phenylalanine, an aromatic residue (mutation S248F) (Steinlein *et al.*, 1995). A mutation by insertion was later described in a Norwegian family; the mutation is due to the insertion of three nucleotides encoding for an additional serine at the extracellular tip of M2 (776 ins 3) (Steinlein *et al.*, 1997). A transposition replacing serine 252 with leucine was also found in a Japanese family (Hirose *et al.*, 2000). An S252L *de novo* mutation found in a woman brought into question the initial diagnosis of sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy (Phillips *et al.*, 2000). Analysis of other families led to the identification of two mutations by the transposition of S252L and S248F (Phillips *et al.*, 2000, Steinlein, 2000).

A Korean child in a family of patients with ADNFLE associated with the S252L mutation has been described; in addition to ADNFLE, the child presents mental retardation and poor therapeutic response to carbamazepine (Cho *et al.*, 2003), suggesting the existence of other genetic or environmental factors.

The study of other families has uncovered a link with 15q24. This type 2 ADNFLE locus contains the clusters created when genes encode other subunits for neuronal acetylcholine receptor: $\alpha 3$, $\alpha 5$ and $\beta 4$ respectively (CHRNA3, CHRNA5, CHRNA4). However, no direct evidence of mutation in these proteins has been uncovered to date (Phillips *et al.*, 1998).

A third locus, type 3 ADNFLE, has been discovered in the pericentromeric region of chromosome 1 (Gambardella *et al.*, 2000). The $\beta 2$ subunit of the nicotinic channel is encoded in this region. Transposition of a guanine to a cytosine in exon 5 of CHRNA2 causes the replacement of valine with leucine in position 287 in M2 (De Fusco *et al.*, 2000). A second mutation of this valine to methionine was identified in a Scottish family (Phillips *et al.*, 2001). These two V287L and V287M mutations affect the same residue, suggesting the possibility of a specific mutation site. Patients presenting mutations in one or the other of subunits $\alpha 4$ and $\beta 2$ are clinically identical. Thus, two different genotypes express the same phenotype (McLellan *et al.*, 2003).

Neuronal acetylcholine receptors are formed by the association of several different subunits (figure 1). Nicotinic receptors are homologous or heterologous pentamers created from 11 known subunits ($\alpha 2$ - $\alpha 9$; $\beta 2$ - $\beta 4$) (Le Novère and Changeux, 1995). The α subunits form the sites of interaction with acetylcholine and are characterized by

the presence of two adjacent cysteines (positions 192 and 193 in the $\alpha 1$ subunit of skeletal muscle) (Galzi *et al.*, 1996). Subunit β likely contributes to the pharmacologic specificity of the receptor (Luetje and Patrick, 1991). In the CNS, there are six types of α subunits ($\alpha 4$ - $\alpha 7$) and three types of β subunits ($\beta 2$ - $\beta 4$) which combine to form receptors with at least two types of different subunits. The predominant combination in the brain is $\alpha 4/\beta 2$ (Whiting *et al.*, 1991). Cerebral distribution of the subunits of this receptor was described as having numerous variations (Deneris *et al.*, 1989, Duvoisin *et al.*, 1989, Wada *et al.*, 1988, Wada *et al.*, 1989, Park *et al.*, 1997, Zoli *et al.*, 1998). Messenger RNA $\alpha 4$ and $\beta 2$ is found in a great number of CNS nuclei, as well as in cholinergic pathways. Although CHRNA4 ($\alpha 4$) and CHRNA2 ($\beta 2$) genes are expressed in many regions of the brain, at this time we cannot make a clear correlation between their distribution and electroencephalographic manifestations recorded during critical episodes in the frontal lobe regions and - if the supposition of CHRNA4 in RPE is confirmed (see below) - in the centrotemporal region. The hypothesis of compensation for loss of function of the $\alpha 4/\beta 2$ receptor by non mutated subunits in regions of the brain other than the frontal lobes is very attractive.

From the physiopathologic point of view, electrophysiological recordings of transfected cells expressing mutated receptors make it possible to define the effects of these mutations on the behaviour of the receptors involved. As far as type 1 ADNFLE is concerned, various *in vitro* studies of these mutations have shown that they produce similar effects: $\alpha 4$ (S248F), $\alpha 4$ (776ins3) and $\beta 2$ (V248F) mutations displace the response curve to acetylcholine to the left (Bertrand *et al.*, 2002). The $\alpha 4$ (S248F) mutation also increase the potential for receptor activation by acetylcholine (Kuryatov *et al.*, 1997), while the $\alpha 4$ (77ins3) mutation reduces calcium-dependent activity during receptor activation by acetylcholine (Steinlein *et al.*, 1997).

As for type2 ADNFLEs, mutated receptors $\beta 2$ (V287L) and (V287M) show great slowing of their desensitization kinetic activities (De Fusco *et al.*, 2000). The V287M mutation also produces an increase in sensitivity to acetylcholine ten times higher than that seen in wild-type receptors (Phillips *et al.*, 2001).

Nicotinic receptors are thought to be located almost exclusively at the presynaptic level, and to regulate the release of neurotransmitters such as glutamate and GABA; the mechanism through which hypoactivity in this channel leads to neuronal hyperactivity is still unknown.

Recently, Pinguet and colleagues (Rodrigues-Pinguet *et al.*, 2003) have formulated the hypothesis that ADNFLE mutations reduce the Ca^{2+} dependence of the $\alpha 4/\beta 2$ acetylcholine response. During the synchronic variation phases of light sleep, Ca^{2+} modulation may present presynaptic acetylcholine receptors from overstimulating glutamate release during repetitive activity. Reducing the Ca^{2+} dependence of the acetylcholine response could

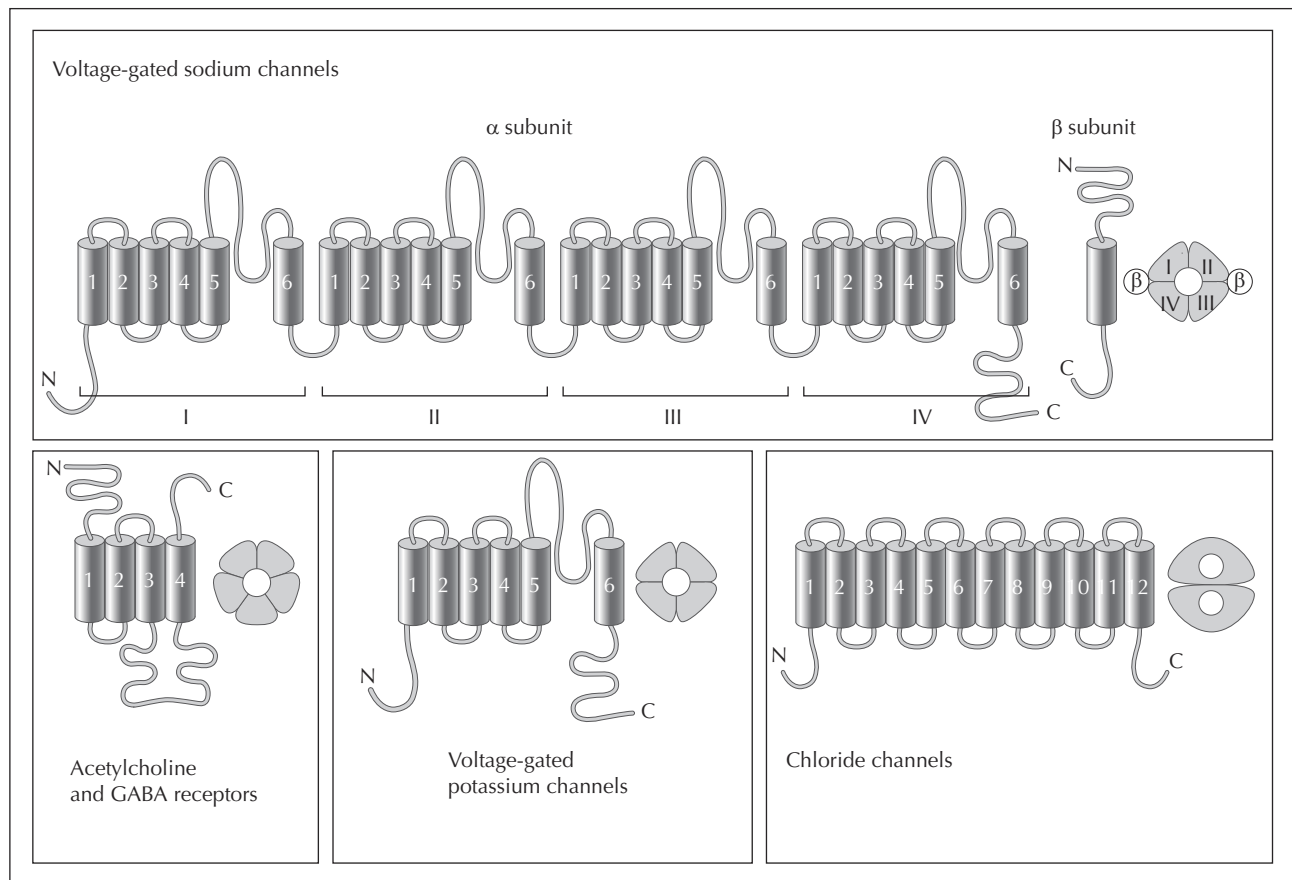


Figure 1. Structure of ion channels and receptor channels associated with epilepsy. Na^+ channels are formed by the association of the main α subunits, made up of four repeated regions (I to IV) with six transmembrane helices, and of β subunits with one transmembrane helix. In α subunits, the N and C terminal endings are cytoplasmic. In β subunits, the N-terminal ending is extracellular. The acetylcholine nicotinic receptors and the GABA receptors are heteropentameric, made up of four-helix transmembrane subunits whose N and C terminal endings are extracellular. K^+ channels are tetrameric in subunits with six transmembrane helices, and Cl^- channels are dimerous in subunits with 12 transmembrane helices. In contrast to other channels, the Cl^- channel dimers contain two ionic pores. In the K^+ and Cl^- channels, N and C terminal endings are cytoplasmic.

trigger seizures by increasing $\alpha 4/\beta 2$ -mediated glutamate release.

From the therapeutic standpoint, the abnormal activity of the identified mutants is blocked by carbamazepine, suggesting that the latter could be used to treat this type of epilepsy. However, the *in vitro* study in question only tested two antiepileptic drugs, sodium valproate and carbamazepine (Picard *et al.*, 1999).

Mice no longer expressing the $\alpha 4$ subunit (murine KO for $\alpha 4$) do not present epileptic phenotypes spontaneously, but do have a higher epileptogenic threshold than wild-type mice when they are stimulated with proconvulsive agents, and particularly with GABAergic inhibitors like bicuculline (BIC) and pentylenetetrazole (PTZ) (Delgado-Escueta *et al.*, 1994, McColl *et al.*, 2003). Another mouse strain in which a large portion of chromosome 2 is deleted (300kb), including the $\alpha 4$ encoding gene and the gene encoding the KCNQ2 K^+ channel, which is involved in

another type of familial epilepsy, presents increased susceptibility to electroshocks (Yang *et al.*, 2003).

Rolandic epilepsy (RE)

This benign epilepsy belongs to the group of partial idiopathic epilepsies. It is the most frequent and the most characteristic of this syndrome group. RPE shows a slight male preponderance; it starts between the ages of three and 13 years, with the average age at onset being 9.9 years; it stops spontaneously before the age of 16. Clinical manifestations include brief motor, clonic, somatomotor or tonic-clonic seizures, hemifacial or affecting the buccopharyngeal-laryngeal area. Seizures are typically sleep-related and are responsible for anarthria and usually without altered consciousness. Secondary generalization is frequent in early progression, with grunt-type vocal manifestations or gurgling related to anarthria and to hy-

persalivation, which often wake the parents. Symptoms can extend to the ipsilateral upper limb.

A somatosensitive component with unilateral paresthesia is frequent in the regions where motor manifestations occur. The EEG shows slow centroparietal high voltage biphasic spikes, increasing in frequency upon falling asleep and at all stages of sleep, during which they tend to become bilateral. In 1998, Neubauer and his colleagues (Neubauer *et al.*, 1998) demonstrated a link between this epileptic syndrome and the q14 region of chromosome 15, after studying 22 small families. The $\alpha 7$ subunit of the neuronal acetylcholine receptor (CHRNA7) is located in this region. In addition, in 1996 Vaughn and his colleagues (Vaughn *et al.*, 1996) found that children presenting complex REs had other anomalies, including large deletion of the long arm of chromosome 1.

Voltage-gated K⁺ channels and benign familial neonatal convulsions

Benign familial neonatal convulsions (BFNC) syndrome is rare, and is transmitted in an autosomal dominant mode. Gene penetrance is 85% (Plouin, 1994). Clinically, convulsions occur on the third day of life and manifest as tonic-clonic seizures, generalized or multifocal, which disappear spontaneously after a few weeks of life. There are great intrafamilial and interfamilial variations in age at onset (from the second day to the fourth month of life), as well as in the duration of manifestations of the disease (from a few days to a few months). Seizures last from a few seconds to several minutes; exceptionally progressing to a status epilepticus (Ronen *et al.*, 1993, Wakai *et al.*, 1994). Initial symptoms include tonic postures of the trunk and limbs, apnea, moaning, oculomotor manifestations and changes in skin colour. Interictal EEGs are normal. Ictal activity often starts by desynchronisation of the EEG. This condition does not usually alter the neurocognitive development of subjects, contrary to most epileptic syndromes starting in the neonatal period. Learning problems or minor cognitive disorders have been reported in a small number of patients (Ronen *et al.*, 1993); 11 to 15% of patients present convulsions (Plouin, 1997) or focal EEG anomalies (Maihara *et al.*, 1999, Neubauer *et al.*, 1997, Coppola *et al.*, 2003). These "tardive convulsions", often occur in response to particular stimuli such as noise or emotional stress (Ronen *et al.*, 1993). In addition, 5% of children with BFNC develop febrile convulsive seizures in childhood (Plouin, 1994).

One of the major loci of BFNC is chromosome 20q13.3 (Leppert *et al.*, 1989, Lewis *et al.*, 1993, Malafose *et al.*, 1992). A link with another locus on chromosome 8q24 has been discovered (Steinlein *et al.*, 1995, Lewis *et al.*, 1993). It is very likely that other loci have not yet been found. The first two genes responsible for this syndrome have been identified recently. They both encode voltage-

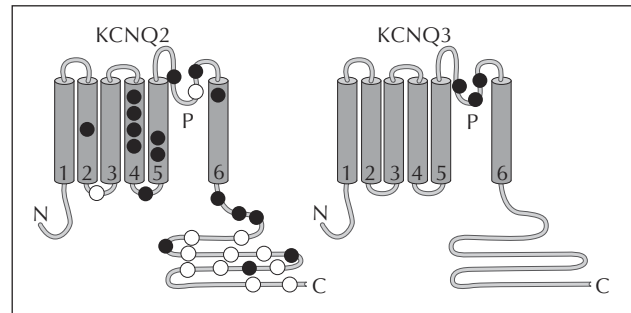


Figure 2. Schematic localisation of mutations associated with epilepsy in subunits KCNQ2 and KCNQ3 of K⁺ channels. The full circles represent missense mutations and empty circles represent other types of mutations, including nonsense mutations, as well as insertions and deletions producing truncated proteins. In KCNQ2, the 29 identified mutations are preferentially located in the fourth transmembrane segment (voltage sensor), in the P domain that contributes to the creation of the channel pore, and in the C-terminal cytoplasmic ending. In KCNQ3, the three identified mutations are located in the P domain.

gated K⁺ channels, KCNQ2 on chromosome 20q (Biervert *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 1998) and another similar gene, KCNQ3, on 8q24 (Charlier *et al.*, 1998). These two genes are transcribed in practically the whole CNS (Biervert *et al.*, 1998).

KCNQ channels are expressed in the myocardium (KCNQ1), in the central nervous system (KCNQ2-5), in the inner ear (KCNQ4) and in skeletal muscle (KCNQ5) (Jentsch, 2000). These channels belong to a family of proteins with many similarities, an intracellular aminoterminal portion, six transmembrane domains (S1 to S6), a P loop between S5 and S6 with a GYG domain which confers potassium selectivity to the pore, and a long carboxy-terminal cytoplasmic chain (figures 1 and 2).

A subgroup of this channel family includes KCNQ2 and KCNQ3, and three other subunits: KCNQ1, KCNQ4 (Kubisch *et al.*, 1999) and KCNQ5 (figures 2 and 3). Genomic analysis of KCNQ2 shows it to be encoded by 18 exons between 30 pb (exon 8 and 10) and a 4-6 kbp (exon 17). It is also interesting to note that genes KCNQ2 and CHRNA4 are only 30 kb apart (see above).

The first identified and described KCNQ2 mutation at the functional level was discovered in an Australian family and consists of a 5pb insertion in the sequence encoding the carboxy-terminal ending (Biervert *et al.*, 1998), which produces a truncated protein. Expressed in the *Xenopus* oocyte, this truncated protein does not express discernable current, indicating total loss of function associated with this mutation. Expression of both mutant and wild-type proteins causes a reduction of expected currents without a negative dominance effect. It is clear that seizures in these patients are due to haploinsufficiency of KCNQ2 (Biervert *et al.*, 1998). Recently, the first dominant negative mutation has been identified (Singh *et al.*, 2003).

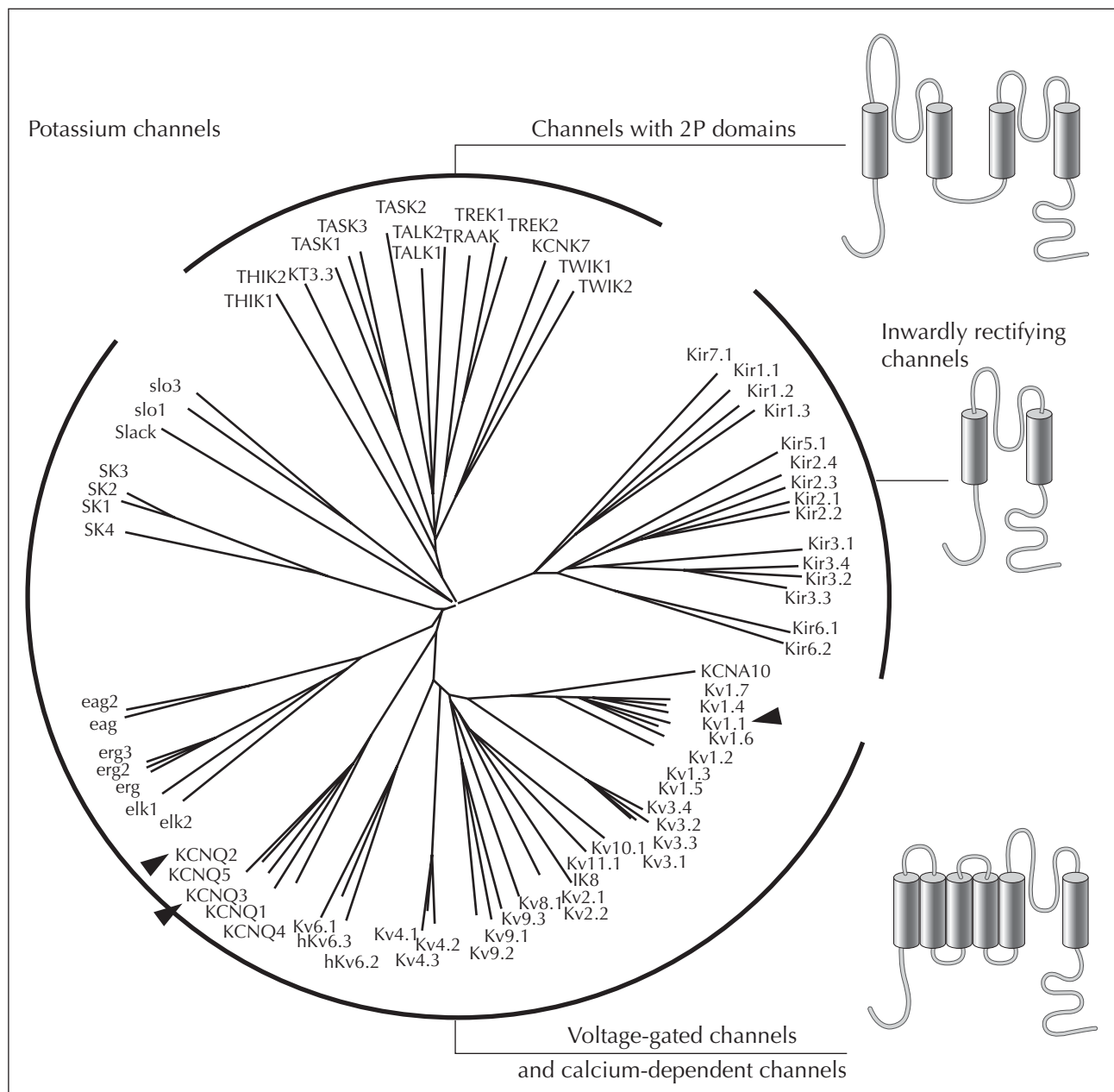


Figure 3. Dendrogram of human K⁺ channels. The 75 channels fall into three large categories according to their sequence homology and their membrane topology. Mutations in KCNQ2, KCNQ3 and Kv1.1 subunits, indicated by a black arrow, are associated with epilepsy.

Expression of both KCNQ2 and KCNQ3 in *Xenopus* oocytes results in heterotetrameric channels whose electrophysiologic properties are different than those of either one of the subunits expressed alone. The heteromeric channels KCNQ2/3 show a current amplitude 11 times greater than that of homomeric channels (Yang *et al.*, 1998). Immunohistochemistry has shown that these KCNQ2 and KCNQ3 subunits immunoprecipitate together from a lysate of the human brain (Cooper *et al.*, 2000). Wang and his colleagues have shown that the M

current is produced by the assembly of the two proteins, KCNQ2 and KCNQ3 (Wang *et al.*, 1998). Given the extensive expression of these two subunits in the CNS, these observations support KCNQ2 and KCNQ3 heteromerisation in the brain. As is the case for ADFLEs, BFNCs are caused by mutations which affect different subunits of the same channel.

M current is a K⁺ current characterized by a slow activation and inactivation conductance. It is expressed in the periphery of sympathetic neurons, as well as in many CNS

structures. It reduces neuronal excitability by causing an efflux of K^+ ions during the formation of action potential; by so doing, it plays a crucial role in neuronal excitability regulation (Jentsch, 2000, Marrion, 1997, Wang *et al.*, 2000, Cooper and Jan, 2003). KCNQ2 mutations responsible for BFNC alter control of excitability by modifying the M current (Schroeder *et al.*, 1998).

Most KCNQ2 mutations are located in the sixth S6 transmembrane domain, at the level of the P pore domain or, in most cases (57%), on the carboxy-terminal loop (Biervert *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 1998, Charlier *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 2003, Lerche *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2000) (figure 2). Mutations affecting the pore reduce K^+ current by modifying channel conductance, but do not affect channel expression to the cell surface (Schwake *et al.*, 2000). Mutations in the carboxy-terminal portion could alter assembly of subunits and reduce the number of functional channels expressed to the cell surface (Lerche *et al.*, 2000, Schwake *et al.*, 2003, Maljevic *et al.*, 2003).

Among all the hereditary epilepsies studied to date, four present KCNQ2 mutations and express a different phenotype than that seen in BFNCs. A familial KCNQ2 mutation located in the voltage sensor domain (S4) results in the BFNC syndrome and, in adulthood, is accompanied by myokymia (involuntary muscle contractions) (Dedek *et al.*, 2001). The other three mutations manifest in seizures that start after the neonatal period, with no remission after the fourth month (Singh *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 2003). These observations reveal the function of these voltage-gated K^+ channels, both in the central and the peripheral nervous system. In addition, some patients from families where KCNQ2 mutations were found also present neonatal convulsions, generalized infantile or adult epilepsies, febrile convulsions plus (generalized tonic-clonic febrile convulsions occurring in patients after the age of six years), or centrottemporal epilepsies. These phenotypes seem particular to each family and are expressed with variable penetrance, which leaves us to suppose that other environmental or genetic factors could be involved in these cases.

There is no clear explanation for BFNC onset solely in the first weeks of life *ex utero*. The only attractive hypothesis is that the immature brain is more vulnerable to small variations caused by mutations in KCNQ2 and KCNQ3 channels. Another hypothesis is that the human brain only expresses these channels in a limited timeframe and that, subsequently, the overexpression of another K^+ channel compensates for the loss of function caused by these mutations. Studies of rat hippocampus during the postnatal period have shown that these KCNQ channels play a predominant inhibitive role in the first week of life, when GABAergic transmission loses its excitatory activity (Okada *et al.*, 2003).

Moreover, two mutations of the gene encoding for a sodium channel subunit, SCN2A, have been found in two families of patients with BFNC, widening the genotypic

spectrum of this condition (Heron *et al.*, 2002). Given the onset of this syndrome during the neonatal period, it is also interesting to study its occurrence in premature infants. In fact, convulsions seem to start at the expected corrected age (Singh *et al.*, 2003), making it possible to suppose that phenomena involved in the production of these seizures are conditioned by brain maturation, and that the latter evolves in the same manner regardless of the milieu in which it takes place.

KO heterozygous KCNQ2^{+/-} mice present neuronal hyperexcitability to PTZ, while KCNQ2^{-/-} homozygous mice die spontaneously in the first 48 hours of life (Watanabe *et al.*, 2000). At present, 29 mutations have been identified in KCNQ2 (Biervert *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2000, Dedek *et al.*, 2001, Moulard *et al.*, 2001, Lerche *et al.*, 2001, Lerche *et al.*, 1999) (figure 2). The three mutations in KCNQ3 are missense mutations in the sequence encoding the pore (Hirose *et al.*, 2000, Charlier *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 2003) (figure 2).

Mutations in other subunits of these channels have been found; they apply to KCNQ1 and KCNQ4. Mutations in KCNQ1 result in cardiac arrhythmia due to Torsade de Pointes as part of long QT syndrome (Romano-Ward syndrome), as well as in long QT syndrome associated with perceptive deafness, Jervell, Lange-Nielsen syndrome (Neyroud *et al.*, 1997, Sanguinetti, 1999, Splawski *et al.*, 2000), or atrial fibrillation (Chen *et al.*, 2003).

Thus, different mutations in KCNQ1 are responsible for different pathologies. Mutations in KCNQ1 responsible for the Jervell, Lange-Nielsen syndrome involve the carboxy-terminal loop and impair assembly of channel subunits (Schmitt *et al.*, 2000).

Mutations in KCNQ4 cause congenital progressive deafness (DFNA2) (Kubisch *et al.*, 1999, Coucke *et al.*, 1999, Talebizadeh *et al.*, 1999, Akita *et al.*, 2001). These mutant subunits act, in all three cases, as negative dominant genes (Kubisch *et al.*, 1999, Chouabe *et al.*, 1997). The latest member of this gene family, KCNQ5, whose protein is expressed both in the CNS and in skeletal muscle, has not yet been linked to any disease (Lerche *et al.*, 2000, Kanamura *et al.*, 2000).

From a therapeutic standpoint, retigabine, a new anti-epileptic drug, activates KCNQ2/3 currents by producing displacement to the left of voltage-dependent activation in these channels (Rundfeldt and Netzer, 2000, Main *et al.*, 2000, Wickenden, 2002). The anticonvulsant effects of retigabine have already been demonstrated on several animal models of epileptic seizures (Rostock *et al.*, 1996, Tober *et al.*, 1996). In a phase II clinical trial, 12 out of 35 patients with pharmacoresistant epilepsies experienced fewer seizures when treated with retigabine (Bialer *et al.*, 2001). It is important to note that this molecule could have an anticonvulsant effect not only by affecting KCNQ2/3, but also by activating GABAergic transmission in the CNS (Kapetanovic *et al.*, 1995).

Voltage-gated K⁺ channels and episodic familial ataxia

Type 2 episodic ataxia (EA2), is a rare autosomic dominant disorder characterized by intermittent episodes of balance problems and myokymia. It is associated with KCNA1 (also called Kv1.1) mutations in a K⁺ voltage-gated channel (*figures 1 and 3*).

Of five patients identified in a Scottish family, two also present a partial epilepsy, indicating that the epilepsy could be secondary to the KCNA1 mutation. Functional *in vitro* studies have shown that the mutant protein produces a negative dominant effect which likely impairs neuronal repolarization (Zuberi *et al.*, 1999).

Over 75 genes encoding the α subunits of K⁺ channels have been cloned in humans. It is the largest ion channel family. Despite this great diversity, these subunits constitute only three structural families (*figure 3*). KCNQ2, KCNQ3 and KCNA1 belong to the category of voltage-gated channels with six transmembrane segments. There is also a category of so-called inwardly rectifying channels, with two transmembrane segments. Many of these voltage-gated and input rectification channels are expressed in the CNS. The latest category of K⁺ channels that has been identified corresponds to subunits with four transmembrane segments and two P domains (Lesage, 2003, Lesage and Lazdunski, 2000). These channels are expressed in the CNS, where they contribute to excitability control. Some are opened by unsaturated fatty acids, by internal acidification or by general volatile anesthetics. Opening the channels with anesthetics causes neuronal hyperpolarization, which no doubt contributes to the general depression of the CNS associated with anesthesia. These channels are excellent targets in the search for new mutant genes in idiopathic epilepsies.

Ca²⁺ voltage-gated channels and epilepsy

The importance of calcium channels in epilepsy has been demonstrated in a number of mouse models of generalized epilepsy (Meisler *et al.*, 2001). These models involve to a great extent absence epilepsy with ataxia, a rare combination in human epileptology. Two publications describe mutations in genes encoding for Ca²⁺ channel subunits in a few patients with generalized epilepsies (Escayg *et al.*, 2000, Jouvenceau *et al.*, 2001), but no functional study of mutations has been carried out to date; nor has there been any other wider genetic study on the subject. These important data are needed to confirm the role of mutations of this type in these forms of epilepsy. Ca²⁺ channels are heteropolymers with one main $\alpha 1$ subunit whose structure is close to that of the α subunits of voltage-gated Na⁺ channels with four repeated homologous domains (*figure 1*), associated with auxiliary β , $\alpha 2\delta$ and γ subunits. There are ten genes encoding $\alpha 1$ subunits in humans; practically all of these subunits are expressed in the CNS.

Na⁺ channels GABAA receptor, generalized epilepsy with febrile seizures *plus* and severe myoclonic epilepsy of infancy

Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+)

Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) is one of the most recently identified epileptic "syndromes" (Scheffer and Berkovic, 1997). It is characterized by a wide range of associated seizures (Scheffer and Berkovic, 1997, Wallace *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 1999). The most affected members of a family present a phenotype generally known as "febrile convulsions plus", a disorder involving numerous generalized tonic-clonic seizures often associated with fever spikes.

In contrast to the clearly defined syndrome of febrile convulsions (FC), the FC+ "syndrome" manifests in children over six years of age and is accompanied by generalized tonic-clonic convulsive seizures with no associated fever. Two thirds of GEFS+ patients present an FC or FC+ phenotype. The remaining third present various types of seizures (for example, tonic-clonic, myoclonic, myoclonic-astatic seizures, absences or atonic seizures).

Voltage-gated Na⁺ channels SCN1A, SCN2A and GEFS plus

Given the wide spectrum of phenotypes, bilinear transmission and a large number of phenocopies (febrile convulsions have an age-dependent frequency of 3 to 5%), the mode of transmission of GEFS+ is still poorly understood. It appears to be complex, and monogenic transmission seems to be the exception. But, as is the case for the two epileptic syndromes described above, the first mutations were identified by studying large families. Regarding a large Tasmanian family, it was strongly argued that a major gene responsible for febrile convulsions is located in 19q13. Further examination of this locus made it possible to identify a mutation in the β SCN1B subunit of the voltage-gated Na⁺ channel (Wallace *et al.*, 1998). Although this subunit is also expressed in skeletal muscle, none of the patients who are carriers of this mutation present signs of myotonia, as it is described in other patients presenting mutations of the SCN4A gene encoding the α subunit of the same Na⁺ channel. A second locus was identified in 2q24-q33 in two French families (Moulard *et al.*, 1999, Baulac *et al.*, 1999).

This locus corresponds to a gene cluster encoding three α subunits of the Na⁺ channels (SCN1A, SCN2A, SCN3A). Mutations of two amino acids have been found in this region of the SCN1A (T875M and R1648H) gene, both located in S4 transmembrane segments corresponding to the voltage sensor of the α subunit (Escayg *et al.*, 2000). Another R187W mutation located in the intracellular loop between domain II and domain III of the SCN2A subunit was also identified (Sugawara *et al.*, 2001).

The voltage-gated Na⁺ channels are made up of one main 260 kDa α subunit that forms a channel capable of generating sodium current in response to membrane depolarization, and two to three small 35 kDa β subunits (Krafte *et al.*, 1988, Krafte *et al.*, 1990, Makita *et al.*, 1994, Isom *et al.*, 1992, Isom *et al.*, 1995, Catterall, 1999) (*figure 1*). Four of the ten α subunits of the human genome are expressed largely in the CNS: SCN1A, SCN2A, SCN3A and SCN8A (Meisler *et al.*, 2001). Channels containing the SCN1A subunit are expressed at the level of inhibitor neurons (Whitaker *et al.*, 2000).

The α subunit is composed of four domains (I to IV), each one containing six transmembrane helices (S1 to S6), as well as a pore P loop. Positively charged amino acids at the S4 helices probably act as the channel's voltage sensor. β subunits seem to modulate inactivation of the channel. At the structural level, the C121W mutation in the SCN1B subunit results in the loss of a disulfide bridge involved in the formation of the immunoglobulin-type motif of the extracellular loop in subunit $\beta 1$.

At the functional level, this mutation leads to slowing of the inactivation kinetics of the sodium current produced by the mutated channel expressed in a heterologous system (Wallace *et al.*, 1998). Concerning SCN1A subunit (Escayg *et al.*, 2000, Escayg *et al.*, 2001, Wallace *et al.*, 2001), functional expression of SCN1A mutations at the level of segments II/S4 and IV/S4, reveals more rapid activation (opening triggered by depolarization) and inactivation (spontaneous reclosing of the activated channel), and absence of residual current (Alekov *et al.*, 2000, Alekov *et al.*, 2001, Spanpanato *et al.*, 2001). The most important modification observed for the mutant IV/S4 is an acceleration of the time of return to the inactive state (Lerche *et al.*, 2001). This observation was made in preliminary studies (Escayg *et al.*, 2001). Moreover, for the two mutations discussed, Lerche and his colleagues found an acceleration of activation time for negative imposed potentials (≤ 20 mV) (Lerche *et al.*, 2001).

GABAergic receptors and GEFS plus

Mutations in a $\gamma 2$ subunit of gabaergic receptor GABA^A have been identified in two families of patients with GEFC+. One of these families shows a typical GEFC+ phenotype (Baulac *et al.*, 2001), while in the other family patients present a combination of febrile convulsions and absence epilepsy (Wallace *et al.*, 2001). The two mutations are located in different regions of the channel, one on the GABA connection site of the extracellular loop (Wallace *et al.*, 2001), the other on the M2 and M3 membrane segment connection loop (Baulac *et al.*, 2001) (*figure 1*). Functional expression of these mutated subunits assembled with subunits α and $\beta 2$ reveals two different kinds of losses of function. The first mutation involving the GABA connection site reduces activation current in the

channel by a factor of ten, while the second expresses current normally activated by the GABA, but is insensitive to benzodiazepines. Regarding the second mutation, Wallace and his colleagues suggest that the receptor's loss of reactivity to "endozepines" leads to neuronal hyperexcitability.

Na⁺ channels and severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome)

Severe myoclonic epilepsy of infancy (SMEI) (Dravet's syndrome) is characterized by clonic and tonic-clonic seizures, generalized or unilateral, often prolonged and initially occurring in a febrile context in the first year of life. Secondly, these children present generalized non-febrile seizures such as myoclonia, absences or tonic-clonic seizures, as well as simple or complex partial seizures. The epilepsy is typically pharmacoresistant. The children also present arrest of psychomotor development with major intellectual retardation.

The recent discovery of mutations in the SCN1A gene leading to the production of truncated proteins in patients with this syndrome allows a better understanding of the mechanisms involved in this serious disease. These mutations are spontaneous (*de novo*) (Claes *et al.*, 2001), contrary to familial mutations found in the GEFC+ syndrome. These missense mutations are most often non functional, or are responsible for drastic reductions in sodium currents. The mutations cause functional modifications opposed to those observed in GEFC+ (Sugawara *et al.*, 2003). Mutations of this gene have been found in 33 to 100% of patients with SMEI (Sugawara *et al.*, 2002, Ohmori *et al.*, 2002, Claes *et al.*, 2003, Wallace *et al.*, 2003, Nabbout *et al.*, 2003). However, the fact that about 50% of patients with SMEI belonged to GEFC+ families remains unexplained (Singh *et al.*, 2001, Fujiwara *et al.*, 2003).

The phenotypic spectrum of SCN1A mutations was extended to other severe infantile epilepsies (Fujiwara *et al.*, 2003). In families of patients presenting both GEFC+ and SMEI, it appears, once again, that other environmental or genetic factors determine the seriousness of the phenotype (Fujiwara *et al.*, 2003, Scheffer and Berkovic, 2003).

Mutations of the CLCN2 chloride channel and absence epilepsy in children and adolescents, juvenile myoclonic epilepsy and epilepsy with grand mal seizures on awakening

Juvenile myoclonic epilepsy

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is one of the best defined epileptic syndromes. Onset is between the ages of six and 25 years, with a peak in frequency at adolescence, between the ages of 12 and 17. The clinical picture reveals

the presence of myoclonic, spontaneous, bilateral tremors, generally symmetrical, isolated or repetitive, involving preferentially the upper limbs and the face, sometimes responsible for falls when they extend to the lower limbs. Myoclonia occur in a fully conscious state, shortly after waking, and they interfere greatly with activities upon rising. Tonic-clonic generalized seizures which usually start with a crescendo of massive, bilateral myoclonia and become clonic-tonicoclonic seizures are associated in 90% of cases with morning myoclonia, and are the most frequent reason for the initial consultation. At that time, myoclonia have been present for months, sometimes years. The intercritical EEG shows generalized spikes waves and polyspikes waves, often asymmetrical, with a frequency of over 3 Hz. Myoclonia, always preceded by a polyspike-and-wave complex on the scalp EEG, can be recorded by means of a polygraphic video EEG exam in the morning upon waking, after sleep deprivation. Response to treatment is spectacular (valproate, benzodiazepines), but JME is pharmaco-dependent: stopping treatment causes a recurrence of clinical symptoms in 90% of cases. Therefore, treatment must continue for a very long time, sometimes for life.

Absence epilepsy in children and adolescents

Childhood absence epilepsy (CAE) is a common form of idiopathic epilepsy occurring in normal, school age children. Peak frequency is at about age seven years. Typical absences are inaugural, very frequent (between 10 and 200 per day), easily triggered by hyperpnea, and taking various forms: simple absences or absences accompanied by discrete tonic, clonic, atonic, automatic or vegetative components. The EEG shows normal background activity, with regular, bilateral, synchronous, symmetrical 3 Hz spike waves discharges, accompanied by clinical absence when their duration exceeds 4 to 5 seconds.

Rhythmic, intercritical posterior delta activity is sometimes detected. Evolution is variable. Absences are easily controlled with treatment (valproate, ethosuximide, lamotrigine) and rarely persist in isolation in adulthood. Juvenile absence epilepsy (JAE) starts later than CAE, around puberty. Absences are much rarer and usually occur in clusters, in the morning upon waking. Critical EEG anomalies correspond to 3Hz spikes sharp wave discharges, or more rapid (4-5 Hz) discharges. Tonic-clonic generalized seizures are associated with absences in 80% of cases. Differential diagnosis with matutinal epilepsy with grand mal seizures can be difficult to make.

Epilepsy with grand mal seizures on awakening

This epilepsy starts in adolescence. Seizures occur exclusively or predominantly shortly after waking in the morning, after a nap or during an evening rest. Factors triggering seizures include sleep deprivation, excessive alcohol consumption and forced waking. EEG tracing can be normal

or can show generalized spikes sharp wave discharges or rapid polyspikes sharp wave discharges, particularly visible in the morning upon waking. Passing forms with rare morning myoclonia and/or rare absences are likely and reinforce the hypothesis of a neurobiological continuum between CAE, JAE, JME and MEGMS (Thomas and Arzi-manoglou, 2003).

CLCN2 Cl⁻ channel

Three different mutations in the CLCN2 chloride channel (Cl⁻) have been discovered in three families where patients present these forms of idiopathic epilepsies (Haug *et al.*, 2003). The CLCN2 channel is abundantly expressed in the CNS, particularly in neurons inhibited by GABA (Sik *et al.*, 2000). It is believed that this channel plays an essential role in maintaining the low intracellular chloride concentrations needed to produce an inhibitive response to GABAergic stimulation (Staley, 1994, Staley *et al.*, 1996, Mladnic *et al.*, 1999). The CLCN2 channel is formed by the assembly of two 898 amino acid polypeptides, having a cytoplasmic amino-terminal portion, 20 different domains (labeled A to R), including 12 potential transmembrane segments, as well as two cystathionine- β -synthetase (CBS) domains at the level of its intracytoplasmic carboxy-terminal (*figure 1*). The opening of this channel is voltage-gated and modulated by variations in intracellular Cl⁻ (Cui *et al.*, 1997).

A drop in Cl⁻ intracellular concentration produces displacement of the activation curve toward more hyperpolarizing potentials. Given this particularity, channel opening occurs only when membrane potential drop below the chloride reversion point, this being the exclusive output of these ions into the extracellular milieu. The channel is encoded with 24 exons at chromosome 3q26 (Thiemann *et al.*, 1992, Cid *et al.*, 1995).

In the first family where four members were epileptic over four generations, three individuals presented JME, one presented MEGMS, and one had electroencephalographic anomalies of the spike sharp wave and polyspike sharp wave type, with no critical symptoms. A 597insG mutation in the CLCN2 channel appears to be responsible for these findings. This insertion introduces an early stop codon (M200fsx231) and produces a truncated protein in which major pore determinants are missing. When expressed alone in tsA201 cells, the mutant protein makes it impossible to observe Cl⁻ current. When expressed with wild-type protein, it produces low intensity Cl⁻ current compared to wild-type current.

In the second family, eight members presented epileptic syndromes: five had MEGMS, one CAE, one had electroencephalographic anomalies of the spike sharp wave type with no paroxystic manifestations; one was a carrier of the mutation identified in the family, but had neither seizures nor EEG anomalies. A del 74-117 mutation was

identified; this variant was found in a healthy population, but in affected individuals, a much greater expression of the variant was noted. The resulting protein is amputated of part of an α helix in the B domain. The truncated protein is properly expressed to the cytoplasmic membrane of the neurons. Expression of this variant in a heterologous system does not produce Cl^- current. Its co-expression with the wild-type protein reveals a negative dominant effect (Haug *et al.*, 2003).

These two mutations, 597insG and del74-117, could lead to an accumulation of intracellular Cl^- , and therefore to a reduction of the GABAergic inhibitive response, and even to an excitatory response responsible for neuronal hyperexcitability causing epileptic seizures.

Of the five individuals in the third family, one is a healthy progenitor, carrier of the mutation; of the three other carriers of the mutations, two presented CAE and one had no clinical symptoms but presented spike sharp wave type anomalies at EEG. The mutation involving the CLCN2 channel is probably G715E. This mutation affects the carboxy-terminal portion located between the two CBS domains. These mutated channels, contrary to the previous two, express normal amplitude current, but their voltage-dependent opening differs from that of wild-type channels. In fact, these mutants are activated at much higher membrane potentials than those observed in wild-type channels. Heterodimers (mutated and wild-type channels) open at intermediary potentials.

The mechanism responsible for hyperexcitability is different in the case of this mutation. After a period of intense synaptic activity responsible for membrane depolarization by the activation of glutamatergic receptors and by the influx of Cl^- ions through the GABAergic receptors, the G715E mutation leads to an increase of Cl^- current during the repolarization phase. This increase in function is believed to make the post-synaptic membrane of GABAergic neurons hyperexcitable, and could therefore be responsible for epileptic seizures. A strain of mice KO for the CLCN2 channel does not develop spontaneous epileptic seizures. Different compensatory mechanisms than those of humans, or anatomic or physiological variations between the two species, could explain this difference.

Just as mutations of the GABA^A receptor are involved in the pathogenesis of idiopathic epilepsies, mutations in the CLCN2 channel cause similar paroxystic manifestations, demonstrating the importance of the GABAergic system in epileptogenesis. Moreover, identification of these genetic mutations both in the CLCN2 channel and in the GABA^A receptor confirms the clinical hypothesis of etiopathogenic connections between the three syndromes described above. In the near future, these findings could lead to a clearer understanding of the mechanisms involved in these idiopathic epilepsies.

Na⁺/K⁺-ATPase and benign familial infantile convulsions (BFIC)

In the past few years, many publications described a focal epilepsy starting in the first months of life and having an idiopathic etiology and favorable evolution (Okumura *et al.*, 2000, Vigevano *et al.*, 1992).

Vigevano *et al.* pointed out the existence of cases with a family history of convulsions, benign evolution in childhood, and autosomic dominant heredity; they proposed the term "benign familial infantile convulsions" to designate this syndrome.

Vanmolkot *et al.* (Vanmolkot *et al.*, 2003) described a genetic connection between hemiplegic familial migraine (HFM) and BFIC, on the basis of mutations in the Na⁺/K⁺ type 2 ATPase pump (ATP1A2), found in a family in which patients presented either episodes of migraine of which some were hemiplegic, or generalized convulsive seizures between the ages of 1.5 and 5 months (no critical electroencephalograms are available) or, in the case of four patients, both migraines and infantile spasms.

Conclusion

Ion channels are responsible for generating and controlling neuronal excitability. Mutations in 12 genes encoding channels, receptors and ion transporters have already been linked with different forms of idiopathic epilepsy. Heterologous expression of mutated channels has made it possible to study the electrophysiologic modifications produced by the mutations. These modifications generally fall into three major categories: loss of function, negative dominance, or more subtle modifications of functional properties.

Despite these findings and knowledge about distribution of these channels in the CNS, a correlation between mutations and electro-clinical data remains difficult to establish. Mutations in the same gene can produce different clinical syndromes, while certain mutations in different genes lead to the same clinical manifestations. Phenotypic variability within the same family suggests the existence of polymorphisms in other genes likely to influence phenotypic expression, such as environmental or developmental factors. New techniques of molecular analysis should facilitate future study of the majority of idiopathic epilepsies whose transmission is complex and involves multiple genes. Despite the questions they continue to elicit, the studies already completed open important perspectives in terms of genetic diagnosis and improved anti-epileptic treatments. □

Acknowledgements. We would like to thank Dr. Pierre Thomas for his invaluable advice, the Association Française contre les Myopathies, and the Paul Hamel Institute.

References

- Akita J, Abe S, Shinkawa H, et al. Clinical and genetic features of nonsyndromic autosomal dominant sensorineural hearing loss: KCNQ4 is a gene responsible in Japanese. *J Hum Genet* 2001; 46: 355-61.
- Alekov A, Rahman MM, Mitrovic N, et al. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J Physiol* 2000; 529(Pt 3): 533-9.
- Alekov AK, Rahman MM, Mitrovic N, et al. Enhanced inactivation and acceleration of activation of the sodium channel associated with epilepsy in man. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 2171-6.
- Baraister M. The genetics of neurological disorders. New York: Oxford University Press, 1990.
- Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, et al. A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1078-85.
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 2001; 28: 46-8.
- Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, et al. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* 1998; 43: 435-45.
- Bertrand D, Picard F, Le Hellard S, et al. How mutations in the nAChRs can cause ADNFLE epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43(Suppl 5): 112-22.
- Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, et al. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Fifth Eilat Conference (EILAT V). *Epilepsy Res* 2001; 43: 11-58.
- Biervet C, Schroeder BC, Kubisch C, et al. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 1998; 279: 403-6.
- Catterall WA. Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Adv Neurol* 1999; 79: 441-56.
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 1998; 18: 53-5.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003; 299: 251-4.
- Cho YW, Motamedi GK, Laufenberg I, et al. A Korean kindred with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation. *Arch Neurol* 2003; 60: 1625-32.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, et al. Properties of Kv-LQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997; 16: 5472-9.
- Cid LP, Montrose-Rafizadeh C, Smith DI, et al. Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (CIC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 407-13.
- Claes L, Ceulemans B, Audenaert D, et al. De novo SCN1A mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat* 2003; 21: 615-21.
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, et al. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1327-32.
- Cooper EC, Aldape KD, Abosch A, et al. Co-localization and co-assembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4914-9.
- Cooper EC, Jan LY. M-channels: neurological diseases, neuro-modulation, and drug development. *Arch Neurol* 2003; 60: 496-500.
- Coppola G, Federico RR, Epifanio G, et al. Focal polymicrogyria, continuous spike-and-wave discharges during slow-wave sleep and Cohen syndrome: a case report. *Brain Dev* 2003; 25: 446-9.
- Corey LA, Berg K, Pellock JM, et al. The occurrence of epilepsy and febrile seizures in Virginian and Norwegian twins. *Neurol-ogy* 1991; 41: 1433-6.
- Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, et al. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1321-8.
- Cui J, Cox DH, Aldrich RW. Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol* 1997; 109: 647-73.
- De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, et al. The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 2000; 26: 275-6.
- Dedek K, Kunath B, Kananura C, et al. Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12272-7.
- Delgado-Escueta AV, Serratosa JM, Liu A, et al. Progress in mapping human epilepsy genes. *Epilepsia* 1994; 35(Suppl 1): S29-S40.
- Deneris ES, Boulter J, Swanson LW, et al. Beta 3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. *J Biol Chem* 1989; 264: 6268-72.
- Dravet C. Les épilepsies graves de l'enfant. *Vie Med* 1978; 8: 543-8.
- Duvoisin RM, Deneris ES, Patrick J, et al. The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4. *Neuron* 1989; 3: 487-96.
- Escayg A, De Waard M, Lee DD, et al. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1531-9.
- Escayg A, Heils A, MacDonald BT, et al. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus--and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 866-73.
- Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 2000; 24: 343-5.
- Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, et al. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2003; 126: 531-46.
- Galzi JL, Edelstein SJ, Changeux J. The multiple phenotypes of allosteric receptor mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1853-8.

- Gambardella A, Annesi G, De Fusco M, *et al.* A new locus for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy maps to chromosome 1. *Neurology* 2000; 55: 1467-71.
- Harvold B, Hauge M. In: Neel JV, Shaw MW, Schull WJ, eds. *Hereditary factors elucidated by twin studies*. Washington, DC: US Public Health Service, 1965: 61-76.
- Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, *et al.* Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet* 2003; 33: 527-32.
- Heron SE, Crossland KM, Andermann E, *et al.* Sodium channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 2002; 360: 851-2.
- Hirose S, Zenri F, Akiyoshi H, *et al.* A novel mutation of KCNQ3 (c.925T->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Ann Neurol* 2000; 47: 822-6.
- Inouye E. Observation of forty twin index cases with chronic epilepsy and their co-twins. *J Nerv Ment Dis* 1960; 130: 401-16.
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, *et al.* Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 1992; 256: 839-42.
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, *et al.* Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 1995; 83: 433-42.
- Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 21-30.
- Jouveneau A, Eunson LH, Spauschus A, *et al.* Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* 2001; 358: 801-7.
- Kananura C, Biervert C, Hechenberger M, *et al.* The new voltage-gated potassium channel KCNQ5 and neonatal convulsions. *Neuroreport* 2000; 11: 2063-7.
- Kaneko S, Wada K. Molecular genetic studies of epilepsies. *No To Shinkei* 1998; 50: 1071-7.
- Kapetanovic IM, Yonekawa WD, Kupferberg HJ. The effects of D-23129, a new experimental anticonvulsant drug, on neurotransmitter amino acids in the rat hippocampus in vitro. *Epilepsy Res* 1995; 22: 167-73.
- Krafte DS, Goldin AL, Auld VJ, *et al.* Inactivation of cloned Na channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 1990; 96: 689-706.
- Krafte DS, Snutch TP, Leonard JP, *et al.* Evidence for the involvement of more than one mRNA species in controlling the inactivation process of rat and rabbit brain Na channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1988; 8: 2859-68.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, *et al.* KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999; 96: 437-46.
- Kuryatov A, Gerzanich V, Nelson M, *et al.* Mutation causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy alters Ca²⁺ permeability, conductance, and gating of human alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 1997; 17: 9035-47.
- Le Novère N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995; 40: 155-72.
- Lee WL, Biervert C, Hallmann K, *et al.* A KCNQ2 splice site mutation causing benign neonatal convulsions in a Scottish family. *Neuropediatrics* 2000; 31: 9-12.
- Lennox WG, Lennox MA. *Epilepsy and related disorders*. London: Churchill, 1960.
- Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T, *et al.* Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* 1989; 337: 647-8.
- Lerche C, Scherer CR, Seeböhm G, *et al.* Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 2000; 275: 22395-400.
- Lerche H, Biervert C, Alekov AK, *et al.* A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol* 1999; 46: 305-12.
- Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F793-F801.
- Lesage F. Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 2003; 44: 1-7.
- Lewis TB, Leach RJ, Ward K, *et al.* Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 670-5.
- Luetje CW, Patrick J. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 1991; 11: 837-45.
- Maiharu T, Tsuji M, Higuchi Y, *et al.* Benign familial neonatal convulsions followed by benign epilepsy with centrotemporal spikes in two siblings. *Epilepsia* 1999; 40: 110-3.
- Main MJ, Cryan JE, Dupere JR, *et al.* Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 253-62.
- Makita N, Sloan-Brown K, Weghuis DO, *et al.* Genomic organization and chromosomal assignment of the human voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit gene (SCN1B). *Genomics* 1994; 23: 628-34.
- Malafosse A, Leboyer M, Dulac O, *et al.* Confirmation of linkage of benign familial neonatal convulsions to D20S19 and D20S20. *Hum Genet* 1992; 89: 54-8.
- Maljevic S, Lerche C, Seeböhm G, *et al.* C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J Physiol* 2003; 548: 353-60.
- Marrion NV. Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 483-504.
- McColl CD, Horne MK, Finkelstein DI, *et al.* Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 2003; 44: 234-43.
- McLellan A, Phillips HA, Rittay C, *et al.* Phenotypic comparison of two Scottish families with mutations in different genes causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44: 613-7.
- Meisler MH, Kearney J, Ottman R, *et al.* Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 567-88.

- Mladinic M, Becchetti A, Didelon F, et al. Low expression of the CLC-2 chloride channel during postnatal development: a mechanism for the paradoxical depolarizing action of GABA and glycine in the hippocampus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 266: 1207-13.
- Moulard B, Guipponi M, Chaigne D, et al. Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) on chromosome 2q24-q33. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1396-400.
- Moulard B, Picard F, le Hellard S, et al. Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36: 275-84.
- Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Ion channels and epilepsy. *Am J Med Genet* 2001; 106: 146-59.
- Nabbout R, Gennaro E, Dalla Bernardina B, et al. Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 2003; 60: 1961-7.
- Neubauer BA, Fiedler B, Himmelein B, et al. Centrottemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology* 1998; 51: 1608-12.
- Neubauer BA, Moises HW, Lassker U, et al. Benign childhood epilepsy with centrottemporal spikes and electroencephalography trait are not linked to EBN1 and EBN2 of benign neonatal familial convulsions. *Epilepsia* 1997; 38: 782-7.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 1997; 15: 186-9.
- Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, et al. Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 17-23.
- Okada M, Zhu G, Hirose S, et al. Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Res* 2003; 53: 81-94.
- Okumura A, Hayakawa F, Kato T, et al. Early recognition of benign partial epilepsy in infancy. *Epilepsia* 2000; 41: 714-7.
- Park HJ, Niedzielski AS, Wenthold RJ. Expression of the nicotinic acetylcholine receptor subunit, alpha9, in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1997; 112: 95-105.
- Phillips HA, Favre I, Kirkpatrick M, et al. CHRN2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 225-31.
- Phillips HA, Marini C, Scheffer IE, et al. A de novo mutation in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000; 48: 264-7.
- Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, et al. Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q13.2. *Nat Genet* 1995; 10: 117-8.
- Phillips HA, Scheffer IE, Crossland KM, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal-lobe epilepsy: genetic heterogeneity and evidence for a second locus at 15q24. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1108-16.
- Picard F, Baulac S, Kahane P, et al. Dominant partial epilepsies. A clinical, electrophysiological and genetic study of 19 European families. *Brain* 2000; 123(Pt 6): 1247-62.
- Picard F, Bertrand S, Steinlein OK, et al. Mutated nicotinic receptors responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy are more sensitive to carbamazepine. *Epilepsia* 1999; 40: 1198-209.
- Plouin P. Benign familial neonatal convulsions and benign idiopathic neonatal convulsions. In: Engel JJ, Pedley TA, eds. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 2247-9.
- Plouin P. Benign idiopathic neonatal convulsions (familial and non-familial): open questions about these syndromes. London: John Libbey, 1994.
- Rodrigues-Pinguet NO, Jia L, Li M, et al. Mammalian five AD-NFLE mutations reduce Ca²⁺ dependence of the {alpha}4{beta}2 acetylcholine response. *J Physiol* 2003; (June 18).
- Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, et al. Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology* 1993; 43: 1355-60.
- Rostock A, Tober C, Rundfeldt C, et al. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res* 1996; 23: 211-23.
- Rundfeldt C, Netzer R. Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. Interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 1063-70.
- Sanguinetti MC. Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 406-13.
- Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* 1997; 120(Pt 3): 479-90.
- Scheffer IE, Berkovic SF. The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 428-33.
- Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, et al. Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *Lancet* 1994; 343: 515-7.
- Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder. *Brain* 1995; 118(Pt 1): 61-73.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, et al. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000; 19: 332-40.
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, et al. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 1998; 396: 687-90.
- Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T. A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO J* 2003; 4: 76-81; (Rep).
- Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, et al. Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 2000; 275: 13343-8.

- Sik A, Smith RL, Freund TF. Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 2000; 101: 51-65.
- Sillanpaa M, Koskenvuo M, Romanov K, et al. Genetic factors in epileptic seizures: evidence from a large twin population. *Acta Neurol Scand* 1991; 84: 523-6.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 1998; 18: 25-9.
- Singh NA, Westenskow P, Charlier C, et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 2003; 126: 2726-37.
- Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, et al. Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia* 2001; 42: 837-44.
- Singh R, Scheffer IE, Crossland K, et al. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol* 1999; 45: 75-81.
- Spampanato J, Escayg A, Meisler MH, et al. Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci* 2001; 21: 7481-90.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102: 1178-85.
- Staley K, Smith R, Schaack J, et al. Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 1996; 17: 543-51.
- Staley K. The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J Neurophysiol* 1994; 72: 273-84.
- Steinlein OK, Magnusson A, Stoodt J, et al. An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 943-7.
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 1995; 11: 201-3.
- Steinlein OK. Neuronal nicotinic receptors in human epilepsy. *Eur J Pharmacol* 2000; 393: 243-7.
- Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, et al. Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology* 2002; 58: 1122-4.
- Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M, et al. Nav1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology* 2001; 57: 703-5.
- Sugawara T, Tsurubuchi Y, Fujiwara T, et al. Nav1.1 channels with mutations of severe myoclonic epilepsy in infancy display attenuated currents. *Epilepsy Res* 2003; 54: 201-7.
- Talebizadeh Z, Kelley PM, Askew JW, et al. Novel mutation in the KCNQ4 gene in a large kindred with dominant progressive hearing loss. *Hum Mutat* 1999; 14: 493-501.
- Thiemann A, Grunder S, Pusch M, et al. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 1992; 356: 57-60.
- Thomas P, Arzimanoglou A. Epilepsies. Paris: Masson, 2003.
- Tober C, Rostock A, Rundfeldt C, et al. D-23129: a potent anti-convulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. *Eur J Pharmacol* 1996; 303: 163-9.
- Vanmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ, et al. Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 2003; 54: 360-6.
- Vaughn BV, Greenwood RS, Aylsworth AS, et al. Similarities of EEG and seizures in del(1q) and benign rolandic epilepsy. *Pediatr Neurol* 1996; 15: 261-4.
- Vigevano F, Fusco L, Di Capua M, et al. Benign infantile familial convulsions. *Eur J Pediatr* 1992; 151: 608-12.
- Wada E, Wada K, Boulter J, et al. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 1989; 284: 314-35.
- Wada K, Ballivet M, Boulter J, et al. Functional expression of a new pharmacological subtype of brain nicotinic acetylcholine receptor. *Science* 1988; 240: 330-4.
- Wakai S, Kamasaki H, Itoh N, et al. Classification of familial neonatal convulsions. *Lancet* 1994; 344: 1376.
- Wallace RH, Hodgson BL, Grinton BE, et al. Sodium channel alpha1-subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology* 2003; 61: 765-9.
- Wallace RH, Marini C, Petrou S, et al. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 2001; 28: 49-52.
- Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, et al. Neuronal sodium channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 859-65.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998; 19: 366-70.
- Wang HS, Brown BS, McKinnon D, et al. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 1218-23.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 1998; 282: 1890-3.
- Watanabe H, Nagata E, Kosakai A, et al. Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem* 2000; 75: 28-33.
- Whitaker WR, Clare JJ, Powell AJ, et al. Distribution of voltage-gated sodium channel alpha-subunit and beta-subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum. *J Comp Neurol* 2000; 422: 123-39.
- Whiting P, Schoepfer R, Lindstrom J, et al. Structural and pharmacological characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 463-72.

Wickenden AD. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1055-60.

Yang WP, Levesque PC, Little WA, *et al.* Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem* 1998; 273: 19419-23.

Yang Y, Beyer BJ, Otto JF, *et al.* Spontaneous deletion of epilepsy gene orthologs in a mutant mouse with a low electroconvulsive threshold. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 975-84.

Zoli M, Lena C, Picciotto MR, *et al.* Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci* 1998; 18: 4461-72.

Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, *et al.* A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain* 1999; 122(Pt 5): 817-25.

7.4 Membrane Potential-regulated Transcription of the Resting K^+ conductance TASK-3 via Calcineurin Pathway (JBC-2006)

Membrane Potential-regulated Transcription of the Resting K⁺ Conductance TASK-3 via the Calcineurin Pathway^{*[S]}

Received for publication, June 26, 2006, and in revised form, July 24, 2006 Published, JBC Papers in Press, July 24, 2006, DOI 10.1074/jbc.M606092200

Marc Zanzouri¹, Inger Lauritzen¹, Fabrice Duprat, Michel Mazzuca, Florian Lesage, Michel Lazdunski, and Amanda Patel²

From the Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6097, Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne 06560, France

The 2P domain K⁺ channel TASK-3 is highly expressed in cerebellar granule neurons where it has been proposed to underlie the K⁺ leak conductance, IKso. In a previous work we showed that expression of TASK-3 increases in cerebellar granule neurons as they mature in culture. Here we show that within the cerebellum, levels of TASK-3 mRNA increase as granule neurons migrate to their adult positions and receive excitatory mossy fiber input. To understand the mechanism of this increase in TASK-3 expression we used an *in vitro* model culturing the neurons in either depolarizing conditions mimicking neuronal activity (25K, 25 mM KCl) or in conditions which approach deafferentation (5K, 5 mM KCl). An important increase in TASK-3 mRNA is uniquely observed in 25K and is specific since other background K⁺ channel levels remain unchanged or decrease. The rise in TASK-3 mRNA leads to an increase in TASK-3 protein and the IKso conductance resulting in hyperpolarization. Blocking L-type calcium channels or their downstream effector calcineurin, abrogates TASK-3 expression and IKso, leading to hyperexcitability. This is the first study demonstrating that depolarization-induced Ca²⁺ entry can directly regulate cellular excitability by dynamically regulating the transcription of a resting K⁺ conductance. The appearance of this conductance may play an important role in the transition of depolarized immature neurons to their mature hyperpolarized state during neuronal development.

Cerebellar granule neurons (CGNs)³ are the excitatory glutamatergic interneurons which transmit mossy fiber input to the Purkinje cells (1–3). The standing outward K⁺ current, IKso, plays an important role in controlling CGN excitability

since it behaves as a leak conductance and is inhibited by the activation of muscarinic acetylcholine receptors (4, 5). For example, in cultured rat CGNs the application of muscarine increases the input resistance and enhances cell excitability by reducing IKso (4). This mechanism has also been shown to have a clear physiological role *in vivo*. In the vestibule cerebellum, inhibition of IKso by acetylcholine released from cholinergic mossy fibers increases the firing frequency of CGNs, which in turn enhances the spontaneous excitatory post-synaptic currents (EPSCs) in Purkinje neurons (6).

The molecular components of IKso have been identified as TASK-1 and TASK-3, members of the tandem pore family of K⁺ channels (7–11). TASK channels are constitutively active leak or background K⁺ channels (7–9). They are highly sensitive to external pH, such that acidic conditions reduce while alkaline conditions enhance their activity (7–9). They are reversibly inhibited by a variety of peptide hormones and neurotransmitters acting *via* Gq-coupled receptors (10, 12–15). CGNs express two subtypes of currents corresponding to either TASK-3 homomeric or TASK-1/-3 heteromeric channels (4, 10, 16–18). These channels are slightly different, in that they show distinct sensitivities to external pH, and only homomeric TASK-3 channels are blocked by certain agents, such as ruthenium red (19, 20) and zinc (21).

It is well documented that elevated concentrations of external potassium, or other depolarizing conditions increase intracellular calcium levels and promote long term survival of CGNs in culture (22–24). It is believed that it mimics the glutamatergic innervation that CGNs receive *in vivo* from mossy fibers by post-natal day 12 (25). Several studies have reported that neurotransmitter or ion channel subunit expression depends on the culture conditions (26–29). For instance, levels of the GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit, the principle subunit of the cerebellum, are lower in CGNs when they are cultured in high K⁺ versus physiological concentrations of K⁺ in the presence of growth factors that inhibit apoptosis (28, 29). In contrast, the GABA_A δ subunit mRNA increases in high K⁺ cultures and its *in vivo* expression coincides with the formation of synaptic contacts of GNs with afferent excitatory mossy fibers within the internal granule layer (IGL). These findings strongly suggest that synaptic depolarization plays a role in the expression of this subunit (28, 29).

Mature neonatal cultures of CGNs express particularly high levels of TASK-3, and most of the currents in 1-week-old cultures correspond to TASK-3 homomeric channels (17, 18).

* This work was funded by La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labélisée) and Association Pour La Recherche Sur le Cancer (Subvention number 3331) and the Institute Paul Hamel and by the CNRS. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental primer information and Fig. 1.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: IPMC-CNRS, UMR6097, 660 Route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France. Tel.: 33-493957730; Fax: 33-493957704; E-mail: patel@ipmc.cnrs.fr.

³ The abbreviations used are: CGN, cerebellar granule neurons; EGL, external granule layer; IGL, internal granule layer; EPSC, excitatory post-synaptic current; RR, ruthenium red; MEF-2, myocyte enhancer factor 2; GABA, γ -aminobutyric acid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CNQX, cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione.

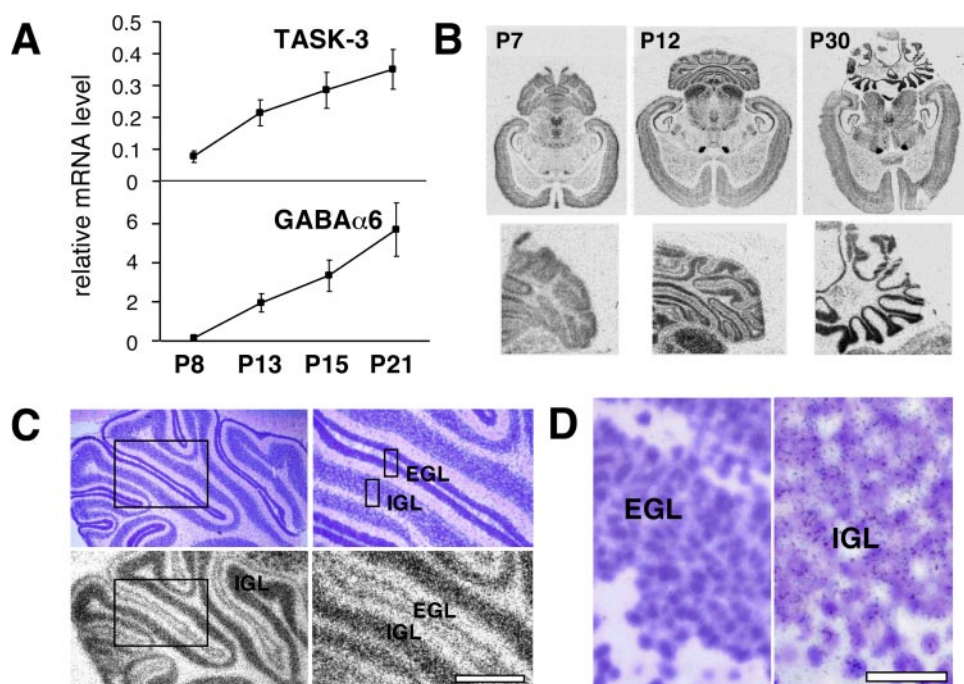


FIGURE 1. The expression of TASK-3 mRNA increases in the developing rat cerebellum. *A*, quantitative PCR analysis of TASK-3 mRNA expressed in the developing cerebellum. RNAs were isolated from 7-, 14-, and 21-day-old rat cerebella, and TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR. The temporal profile of TASK-3 expression was compared with the expression profile of GABA α 6, a well known marker of CGN maturation. Data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of three experiments. *B*, transversal brain sections from postnatal day 7, 12, and 30 rats (P7, P12, and P30) were hybridized with α -³²P-labeled cRNA probe for TASK-3 and exposed to autoradiographic film. *C*, cerebellar slice from a P12 rat: high resolution images of the autoradiographic film and images of the corresponding brain slice after histological staining with cresyl violet. *D*, photomicrographs of a P12 liquid emulsion-coated and counterstained cerebellar section illustrating the EGL (left) and IGL layer (right). Scale bar: in *C* = 400 μ m; in *D* = 15 μ m.

Indeed, this increased expression of TASK-3 is largely responsible for K⁺-dependent apoptosis observed in CGNs (11, 17). In the present work, we took advantage of the CGN cell culture model to understand the mechanism of TASK-3 up-regulation and determine that depolarization-induced Ca²⁺ influx is involved in the regulation of TASK-3 expression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Cultures and Treatments—Cerebellar granule neurons were prepared from 7–8-day-old Wistar rats (Charles River France) decapitated under anesthesia with isoflurane. Cultures were prepared as described previously (17). 2×10^6 neurons were seeded on poly-L-lysine (50 μ g/ml)-coated or Biocoat[®] 35-mm dishes (Falcon) and cultured in Eagle's minimal essential medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 2 mM glutamine, BDNF (50 ng/ml), and 0.5% penicillin-streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. To prevent growth of glial cells, cytosine arabinoside (Ara-C) (10 μ M) was added to the cultures 1 day following plating. Where indicated 20 mM KCl (25K medium) or the same volume of 20 mM NaCl as control (5K medium) were added 3 h following plating. Nifedipine (10 μ M), FK506 (2.5 μ g/ml), cyclosporin A (1 μ M), or KN93 (5 μ M), all purchased from Sigma, were added 3 h after plating. Actinomycin D (10 μ g/ml) and cycloheximide (10 μ g/ml) were added 1–2 days after plating. Corresponding solvents were added in the control conditions.

Hippocampal and cortical neurons were prepared from 18–19-day-old fetal Wistar rats (Charles River France). 2×10^6 neurons were seeded on poly-D-lysine-coated plates and cultured in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% horse serum (Sigma), 2 mM glutamine, and 0.5% penicillin-streptomycin at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂. To prevent growth of glial cells, cytosine arabinoside (Ara-C) (10 μ M) was added to the cultures 1 day following plating. Where indicated 20 mM KCl (25K) or 20 mM NaCl (5K) were added 3 h following plating. As indicated, nifedipine (10 μ M) was added 3 h following plating.

COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.5% penicillin-streptomycin at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂. Cells were transfected with rat TASK-3 or rat TASK-1 cDNAs using the DEAE-dextran method. These cells were used for either Western blot analysis or immunocytochemistry.

Total RNA Extraction, Reverse Transcription, and Quantitative PCR—Total RNAs from hippocampal, cortical, and cerebellar granule neurons cultured in 35-mm dishes were extracted with the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed with 2 μ g of total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR assays for each gene target were performed on cDNA samples using SYBR Green Mastermix Plus (Eurogentec) in 96-well optical plates on an ABI Prism 7700 sequence detection system (PE Biosystems). PCR data were captured using Sequence Detector Software. The data were analyzed using the comparative C_T method where the amount of target is normalized to an endogenous reference (cyclophilin D) (User Bulletin Number 2, Applied Biosystems). Experiments were performed in triplicate. Primer sequences, which were used for quantitative PCR, are provided in the supplemental information. Standard curves were generated for each set of primers using serial dilutions of rat brain cDNA to ensure a similar efficiency of amplification.

In Situ Hybridization—For *in situ* hybridization, post-natal day 6, 12, and 30 (P6, P12, and P30) Wistar rats were anesthetized and decapitated. Brains were removed and frozen at –40 °C. Horizontal and coronal brain sections (12 μ m) were cut in a cryostat (Leica), thaw-mounted onto charged slides (Superfrost Plus), and immediately fixed for 5 min in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde, pH 7.4. Prehybridization and hybridization were performed as described previously (30).

31) using identical α -³²P-labeled sense and antisense riboprobes. After hybridization, slides were washed and exposed to film (BioMax, Eastman Kodak Co.) for about 6–7 days. The resulting autoradiograms were imaged using a film scanner at 3000 dpi resolution and processed in Adobe Photoshop. Selected slides were then covered with photographic emulsion (Hypercoat RPN40, Amersham Biosciences) and left to expose at 4 °C for 5 weeks. After development, slides were stained with cresyl violet.

Preparation and Characterization of a Polyclonal Rabbit TASK-3 Antibody—Anti-TASK-3 antibodies were raised against a glutathione S-transferase fusion protein containing the carboxyl-terminal 55 amino acids of mouse TASK-3 (from Thr³⁴⁸ to Ile⁴⁰², GenBankTM accession number NP001029048). The preparation of fusion proteins and rabbit immunization were performed as described previously (32).

Immunocytochemistry—Cerebellar granule neurons or COS transfected cells were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 20 min, treated with 50 mM NH₄Cl, and permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 5 min. After blocking for 1 h in phosphate-buffered saline containing 5% goat serum and 0.1% Tween 20, cells were incubated with TASK-3 antibody (1:500 to 1:1000) overnight at 4 °C. After washes, cells were incubated in goat anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 (1/800) for 1 h at room temperature. Cells immunoreactive for TASK-3 were visualized using an epifluorescence microscope (Axioplan 2, Carl Zeiss) equipped with 25× and 63× oil immersion objectives. Images were recorded with a cooled CCD camera (Cool-snap HQ, Photometrics) driven by Metavue software.

Electrophysiological Recordings—Currents were recorded in the perforated patch configuration or in the standard whole cell configuration. The external solution contained (in mM) 120 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 5 glucose, 10 HEPES, pH 7.4 with NaOH. In the depolarizing solution, 20 mM of NaCl was replaced with KCl. The perforated patch pipette solution contained 240 μ g/ml amphotericin B, and (in mM) 125 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 EGTA, and 5 HEPES, pH 7.2 with KOH. The whole cell patch pipette solution contained (in mM) 140 KCl, 2 MgCl₂, 2 K-ATP, 2.7 CaCl₂, 5 EGTA, and 10 mM HEPES, pH 7.4 with KOH. Cells were continuously superfused with a microperfusion system during the time course of the experiments (0.1 ml/min). Experiments were performed at room temperature. Acidic pH of the external solution was obtained with HCl. CNQX stock solution (20 mM, distilled water) were stored at –20 °C and used on the day of experiment. Zinc and ruthenium red (Sigma) were directly dissolved in the external medium. The synaptic activity was analyzed using Mini-analysis program (Synaptosoft, Fort Lee, NJ), the threshold for detection was 15 pA.

RESULTS

During cerebellar development, CGNs initially localized in the external granule layer (EGL) migrate across the molecular layer to reach the IGL. Within the IGL, GNs synapse with afferent glutamatergic mossy fibers (1–3). We have previously shown that the level of TASK-3 mRNA increases as a function of cerebellar development (17). In this work, we show that the highest increase in TASK-3 mRNA occurs in

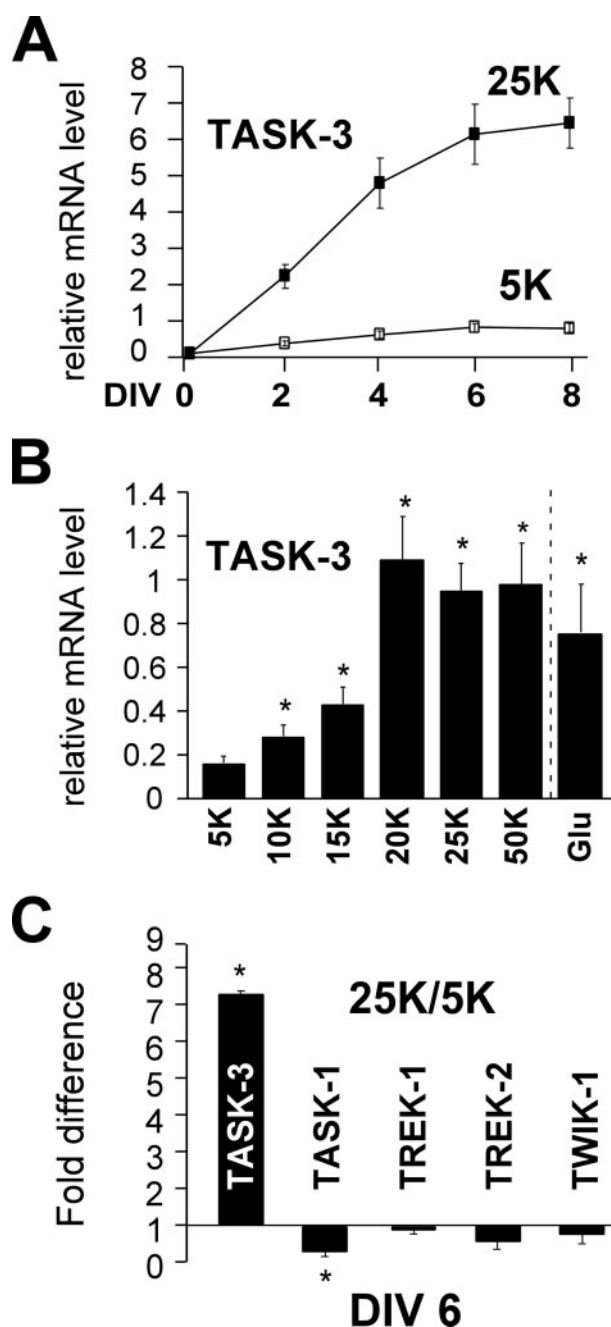


FIGURE 2. KCl-induced depolarization specifically increases TASK-3 mRNA in CGNs. A, CGNs were maintained in 5K or 25K for 0, 2, 4, 6, or 8 days, and the corresponding RNAs were isolated. TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR and data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. B, CGNs were maintained for 2 days in a 5–50 mM KCl gradient (5K, 10K, 15K, 20K, 25K, or 50K) or 5 mM KCl containing 100 μ M glutamate. RNAs were isolated at day 2 from cultures maintained in each condition. The TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR, and data were normalized as in A. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the TASK-3 mRNA level in 5K. C, CGNs were maintained in 5K or 25K for 6 days. RNAs were isolated at day 6 from cultures maintained in each condition. TASK-3, TASK-1, TREK-1, TREK-2, and TWIK-1 mRNA levels were assessed by quantitative PCR, and data were normalized as in A–C. Data were plotted as a ratio of 25K to 5K. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments.

the second week after birth. The temporal expression profile of TASK3 mRNA parallels that of the GABA_A α 6 receptor subunit mRNA, a well known marker of mature CGNs (33)

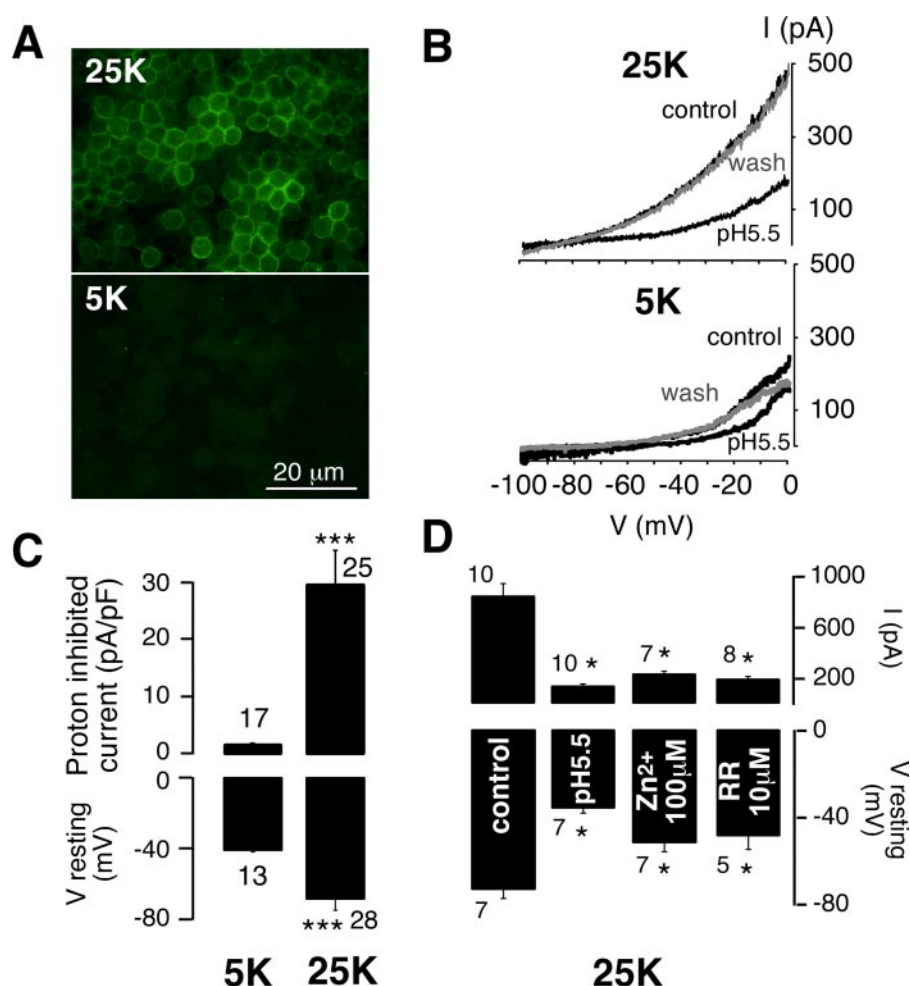


FIGURE 3. KCl-induced depolarization increases TASK-3 protein levels and the I_{Kso} conductance in CGNs.

A, CGNs were maintained in 5K or 25K for 7 days. Immunocytochemistry was performed using a rabbit polyclonal TASK-3 antibody (which was characterized in this paper) and a Alexa Fluor® 488 secondary antibody. B, whole cell currents elicited by voltage ramps from 0 to -100 mV, 1 s in duration, from a holding potential of 0 mV. Neurons were cultivated in 5 mM K⁺ or in 25 mM K⁺ and always recorded in 5 mM K⁺ external solution. An acidic solution at pH 5.5 was applied and washed out as indicated. C, means of the proton-sensitive currents recorded at 0 mV in the same conditions as in B. Currents were normalized to the capacitance of the neurons. The resting membrane potentials were measured under zero current clamp at the beginning of each patch-clamp experiment. The number of tested neurons are indicated. D, current and membrane potential recorded upon perfusion of acidic solution, pH 5.5, zinc (100 μ M), and ruthenium red (RR, 10 μ M) in neurons cultivated in 25K.

(Fig. 1A). *In situ* hybridization analysis of rat brain slices at different developmental stages using a TASK-3 specific anti-sense riboprobe was used to study TASK-3 expression in detail. Little or no labeling was observed with the corresponding sense probe (data not shown). At postnatal day 7 (P7), before the migration of CGNs, a weak expression of TASK-3 was observed in the EGL (Fig. 1B). At postnatal day 12 (P12), neurons that had reached the IGL were strongly labeled compared with granule neurons remaining in the EGL (Fig. 1, B–D). In adult (P30), the hybridization signal was slightly increased compared with the signal in the IGL at P12. As previously described, TASK-3 mRNA is strongly expressed in the adult cerebellum but is also abundant in many other brain structures such as the cerebral cortex, hippocampus, striatum, and brain stem (30). Taken together, these findings show that the increase of TASK-3 mRNA levels in granule neurons coincides with their arrival in the IGL and suggest that depolarization due

to synaptic activity may contribute to the increase in TASK-3 mRNA expression.

To test the hypothesis that neuronal depolarization plays a role in increasing TASK-3 expression, cultured CGNs were grown in a medium containing either a physiological (5 mM, 5K medium) or depolarizing (25 mM, 25K medium) concentrations of KCl. Granule neurons cultivated in 5K die by apoptosis during the first days in culture. To prevent apoptosis, BDNF was added to the culture medium. BDNF by itself did not modify TASK-3 mRNA expression in either 5K or 25K (data not shown). As shown in Fig. 2A, TASK-3 mRNA expression increases significantly in depolarizing *versus* physiological conditions depending on the number of days in culture (Fig. 2A). The TASK-3 mRNA levels increase as a function of external potassium concentration with maximal levels at 20 mM KCl (Fig. 2B). Since K⁺-dependent depolarization is thought to mimic glutamatergic excitatory mossy fiber stimulation *in vivo* (25), we also examined the effect of glutamate on TASK-3 expression. Treating the cells with 100 μ M glutamate for 48 h, similarly increased TASK-3 mRNA levels to those obtained with exposure to 25 mM KCl (Fig. 2B). Given that other background K⁺ channels are also expressed in the cerebellum, we tested whether their expression was also regulated by KCl-induced

depolarization. Among the two pore K⁺ channels tested, only the mRNA for TASK-3 is up-regulated, while the others are either down-regulated or remain unchanged (Fig. 2C). Interestingly, TASK-1, which can associate with TASK-3 to form heteromeric channels (17, 19, 20), was found to be significantly down-regulated by KCl.

To follow whether the rise in TASK-3 mRNA is reflected by an increase in TASK-3 protein, we generated an antibody against the carboxyl terminus of mTASK-3. Anti-TASK-3 specifically detects a duplex in lysates from COS cells transfected with rTASK-3, while no bands were detected in the control conditions (supplemental Fig. 1A). The antibody was also characterized using immunocytochemistry on COS cells transfected with the rTASK-3 subunit. Only cells expressing rTASK-3 were labeled, while cells transfected with the rTASK-1 subunit or the vector alone were not fluorescent (supplemental Fig. 1B). Immunocytochemistry was also performed

Transcriptional Control of TASK Leak K⁺ Channels

on CGNs cultured in either 5K or 25K for 7 days. A specific membrane labeling was observed for TASK-3 only under depolarizing conditions (Fig. 3A) demonstrating that the increase in TASK-3 mRNA leads to a concomitant increase in protein.

We and others (4, 17, 18) have previously shown that the TASK channels underlie IK_{so} in CGNs cultured in 25K. A detailed electrophysiological comparison between granule neurons cultured in 5K *versus* 25K was performed. Depolarizing medium significantly increases the amplitude of the pH-sensitive IK_{so} component (29.3 ± 6.0 pA, $n = 25$, $p = 0.0005$) as compared with the current observed in neurons cultured in 5K (1.6 ± 0.3 pA, $n = 17$, $p = 0.0005$) for a period of 6–10 days (Fig. 3B/C). Conditions that increase IK_{so} current lead to membrane hyperpolarization (Fig. 3C). The resting membrane potential measured in physiological K⁺ concentration was -40.9 ± 3.4 mV ($n = 13$) as compared with -68.4 ± 2.9 mV in depolarizing conditions ($n = 28$, $p < 10^{-5}$).

We used a pharmacological approach to distinguish the TASK-3 homomer from TASK-1 homomeric and TASK-1/-3 heteromeric channels. Zinc (100 μ M) and ruthenium red (10 μ M) are known to selectively inhibit TASK-3 homomers (19, 20, 21). Zn²⁺ (100 μ M) and ruthenium red (10 μ M) reduced the current to $25.7 \pm 3.4\%$ ($n = 7$, $p = 0.001$) and $23.1 \pm 2.6\%$ ($n = 8$, $p = 0.0006$), respectively, which is the same degree of inhibition observed with acidosis (pH 5.5), which was $16.7 \pm 2.3\%$ ($n = 10$, $p < 10^{-4}$) (Fig. 3D). The application of Zn²⁺ and ruthenium red leads to membrane depolarization (25K: -73.6 ± 4.2 mV, $n = 7$; 25K, pH 5.5: -35.9 ± 2.5 mV, $n = 7$, $p < 10^{-6}$; 25K + Zn²⁺: -51.9 ± 4.3 mV, $n = 7$, $p = 0.0002$; 25K + RR: -48.8 ± 6.2 mV, $n = 5$, $p = 0.0005$). These results confirm that the TASK-3 homomeric channel is the principle component of IK_{so} recorded in 25K. The difference observed between current inhibition obtained with external acidosis and that with Zn²⁺/RR could be due to TASK-1 homomers and/or TASK-1/-3 heteromers, since both channels are resistant to inhibition by Zn²⁺ and RR. Indeed, PCR quantification experiments reveal that TASK-3 mRNA levels strongly increase in 25K, while levels of TASK-1 mRNAs decline, which might explain the low levels of TASK-1/-3 heteromeric channels and/or TASK-1 homomeric channels under such culture conditions.

Potassium depolarization of granule neurons leads to the activation of the L-type voltage-dependent calcium channel (24, 35). To establish whether calcium entry via voltage-dependent calcium channels is responsible for the increase in TASK-3 expression, we used the L-type inhibitor nifedipine. Nifedipine totally blocks the depolarization-induced increase in TASK-3 mRNA (Fig. 4A), suggesting a correlation between an increase in intracellular calcium and TASK-3 mRNA levels. Increases in intracellular Ca²⁺ lead to the activation of calcineurin, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, which is crucial for the regulation of the expression of numerous genes in CGNs (36, 37). To test whether this phosphatase plays a role in the expression of TASK-3, granule cells were cultured under depolarizing conditions in the presence or absence of FK506 (2.5 μ g/ml) and cyclosporin A (1 μ M), two inhibitors of calcineurin (38). FK506 and cyclosporin A prevent the depolarization-induced increase in TASK-3 mRNA (Fig. 4A). Moreover, the TASK-3 protein and consequently IK_{so} are

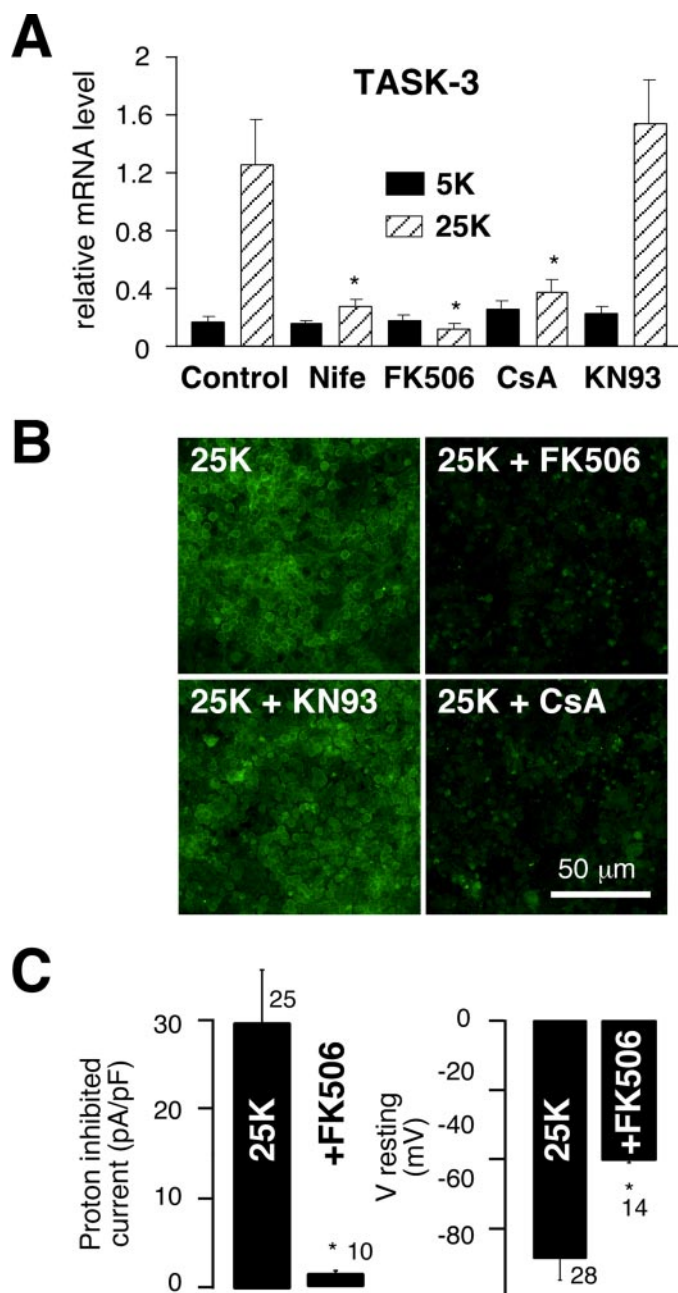


FIGURE 4. The depolarization-induced increase in TASK-3 mRNA expression depends on Ca²⁺-induced activation of calcineurin. A, CGNs were maintained in 5K or 25K in the presence or absence of nifedipine (Nife), FK506, cyclosporin A (CsA), or KN93. RNAs were isolated at day 2 from cultures maintained in each condition. The TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR and data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the TASK-3 mRNA level in 25K control. B, CGNs were maintained in 25K, 25K + FK506, 25K + KN93, and 25K + CsA. Immunocytochemistry was performed at day 7 using the TASK-3 primary antibody and an Alexa Fluor[®] 488 secondary antibody. C, neurons were cultivated in 25 mM K⁺ or in 25 mM K⁺ with FK506 and recorded at 6–10 days *in vitro*. Means of the proton-sensitive currents recorded at 0 mV in the same conditions as in Fig. 3. Currents were normalized to the capacitance of the neurons. The resting membrane potentials were measured under zero current clamp at the beginning of each patch-clamp experiment. The number of tested neurons is indicated.

also strongly reduced by these calcineurin inhibitors (Fig. 4, B and C). Acute application of FK506 on neurons cultured in 25K has no immediate effect on IK_{so} (data not shown). KN93, an

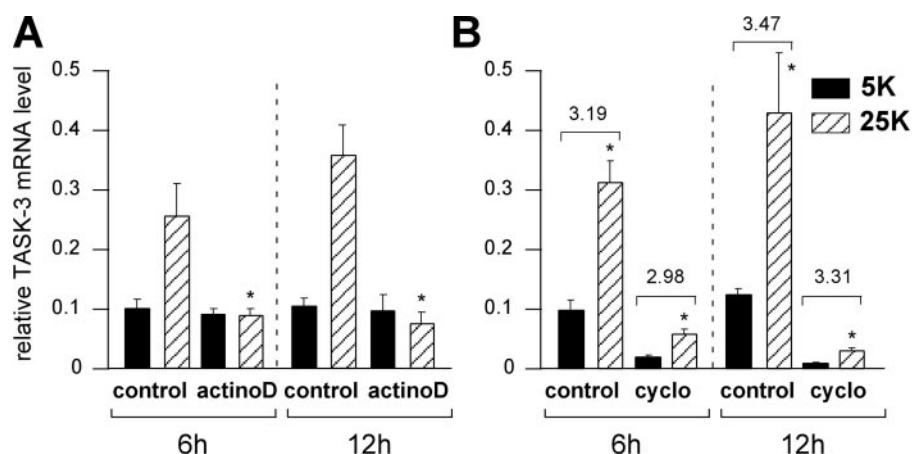


FIGURE 5. Transcriptional activity, but not *de novo* protein synthesis, is required for the depolarization-induced increase in TASK-3 mRNA. *A*, cerebellar granule neurons were maintained in 5K or 25K in the absence or presence of Actinomycin D (*actinoD*) for 6 or 12 h. RNA was isolated at designated times from cultures maintained in each condition. The TASK-3 mRNA level was assessed by quantitative PCR, and data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the TASK-3 mRNA level in 25K control. *B*, cerebellar granule neurons were maintained in 5K or 25K in the absence or presence of cycloheximide (*cyclo*). RNA was isolated at designated times from cultures maintained in each condition. TASK-3 mRNA level was assessed by quantitative PCR and data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the corresponding 5K TASK-3 mRNA level.

inhibitor of CaM kinases, which are also downstream effectors of Ca²⁺ signaling (39), was without effect on either TASK-3 mRNA or protein in 25K (Fig. 4, *A* and *B*). Furthermore, cells grown in 25K with FK506 display depolarized resting membrane potentials with values close to those recorded in cells grown in 5K conditions (Fig. 4C, *right panel*) indicating that FK506 is acting at the level of TASK-3 expression to decrease IKso.

Ca²⁺-dependent TASK-3 expression could occur at the transcriptional and/or the post-transcriptional level. To establish whether transcriptional activity is required for the up-regulation of TASK-3, cells were incubated for 6 or 12 h in the presence of actinomycin D, an inhibitor of mRNA synthesis. Actinomycin D prevents the increase in TASK-3 mRNA which occurs when cell cultures are switched from 5K to 25K (Fig. 5A). In contrast, under the same conditions, the protein synthesis inhibitor cycloheximide fails to block this up-regulation suggesting that *de novo* protein synthesis is not required for Ca²⁺-dependent TASK-3 mRNA up-regulation (Fig. 5B). While application of cycloheximide does lead to a decrease in TASK-3 mRNA levels (Fig. 5B), this occurs in both 5K and 25K, suggesting that *de novo* protein synthesis is necessary for stabilizing the messenger but in a calcineurin-independent manner (Fig. 5B).

To determine the kinetics of the response of TASK-3 mRNA expression, 48-h-old cultures grown in 5K were either maintained in 5K or switched to 25K. A significant increase in TASK-3 mRNA levels is observed within 6 h of KCl-induced depolarization (Fig. 6A). However, a constant depolarization is required to maintain the level of TASK-3 transcripts, since cultured CGNs, which were maintained for 48 h in 25K medium and subsequently switched to 5K medium for 3, 6, or 9 h (Fig. 6B) show a rapid decrease in TASK-3 transcripts. The level of the TASK-3 transcript in switched cultures for 6 and 9 h was $76 \pm 20\%$ and $31 \pm 10\%$ of that observed in control cultures

maintained in 25K medium, respectively ($p < 0.01$). These results demonstrate that cultured CGNs require the continued presence of depolarizing conditions to maintain expression of the TASK-3 subunit mRNA and that this regulation is dynamic.

As mentioned above, cells grown in 25K, *i.e.* expressing high levels of TASK-3, are more hyperpolarized (about -70 mV for 8 days *in vitro*) than cells grown in the presence of FK506 (-40 mV) (Fig. 4C) or cells grown in 5K (-40 mV) (see Fig. 3C), strongly suggesting a direct control of the resting membrane potential by IKso/TASK-3. Since CGNs, particularly rat GNs compared with mouse GNs, grown in high potassium are electrically silent (29, 40, 41) and display hyperpolarized resting potentials (4, 16, 17, 29), we analyzed the influence of IKso/TASK-3

expression on the synaptic activity of the GNs. The current of a single neuron was recorded at -60 mV in the whole cell configuration to follow glutamate receptor activation. An acute perfusion of a K⁺-rich solution was applied to the neurons surrounding the patched neuron and the EPSCs were recorded. Only the neuron cultivated in 25K + FK506 presents a statistically significant large induced synaptic activity which is sensitive to the AMPA receptor blocker CNQX (Fig. 7A). The mean induced activities in 25K and in 25K + FK506 were significantly different (t test: $p = 0.041$) (Fig. 7B). In the 25K + FK506 condition the induced activity is significantly different in the presence and absence of CNQX (t test; $p = 4.4 \times 10^{-4}$, $n = 4$), which is not the case for the 25K condition (t test; $p = 0.16$, $n = 7$). These findings strongly suggest that the highly increased excitability of granule neurons grown in the presence of FK506 is explained by a lower expression of TASK-3 and show the important impact of IKso expression within these neurons.

To study whether other neuronal subtypes expressing the TASK-3 mRNA are similarly sensitive to K⁺-induced depolarization, we quantified the mRNA levels in fetal cultures from either hippocampus or cortex grown in high potassium for 48 h in the absence or presence of nifedipine (Fig. 8). Both neuronal subtypes show a nifedipine-sensitive increase in TASK-3 transcripts. However, the level of Ca²⁺-induced TASK-3 transcript is significantly lower than that observed in cerebellar granule neurons, approaching levels observed in 5K. Nevertheless, these findings demonstrate that transcriptional regulation of TASK-3 by intracellular Ca²⁺ is not unique to CGNs and suggest that this regulation may be an important mechanism throughout the brain.

DISCUSSION

Since the resting K⁺ conductance IKso is largely encoded by TASK-3 (17, 18), we wanted to determine how TASK-3 expres-

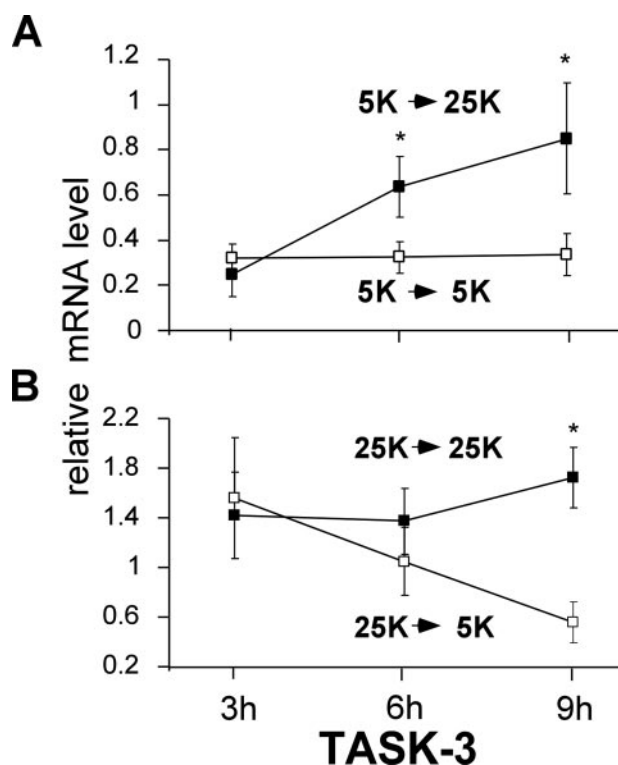


FIGURE 6. KCl depolarization rapidly induces TASK-3 mRNA expression and is necessary to maintain high mRNA levels. *A*, CGNs were maintained for 2 days in 5K and switched to 5K or 25K for 3, 6, or 9 h. RNAs were isolated at designated times from cultures maintained in each condition. The TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR and data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the corresponding data point in 5K. *B*, CGNs were maintained for 2 days in 25K and switched to 25K or 5K for 3, 6, or 9 h and the corresponding RNAs were isolated. The TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR, and data were normalized as described in *A*. Each data point represents the mean \pm S.E. of nine experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the corresponding data points in 25K.

sion increases as a function of neuronal maturity. Because neuronal maturity is achieved by culturing CGNs in depolarizing conditions (25), we compared TASK-3 expression in conditions mimicking deafferentation (physiological K^+ /BDNF) to conditions mimicking neuronal activity (high concentrations of K^+ /BDNF). This study shows a central role for depolarization induced Ca^{2+} influx in the regulation of TASK-3 expression in cultured CGNs. Changes in the level of TASK-3 mRNA in response to depolarizing stimuli paralleled those observed during granule neuron development in the cerebellum in which a high increase in mRNA levels coincides with the formation of synaptic contacts between GNs and excitatory mossy fibers. It has been observed in numerous neuronal cell types, including CGNs, that the resting membrane potential shifts from a relatively depolarized state to a more hyperpolarized state during maturation (24). Thus, the results of our study suggest that the depolarization dependent expression of TASK-3 might play an important role in this transition.

Our studies show that K^+ -induced elevation in intracellular calcium mediates the increase in transcription of TASK-3 mRNA. Nifedipine, a blocker of L-type calcium channels, prevents the increase in TASK-3 mRNA levels, suggesting that calcium entry via these channels is involved in regulating channel expression.

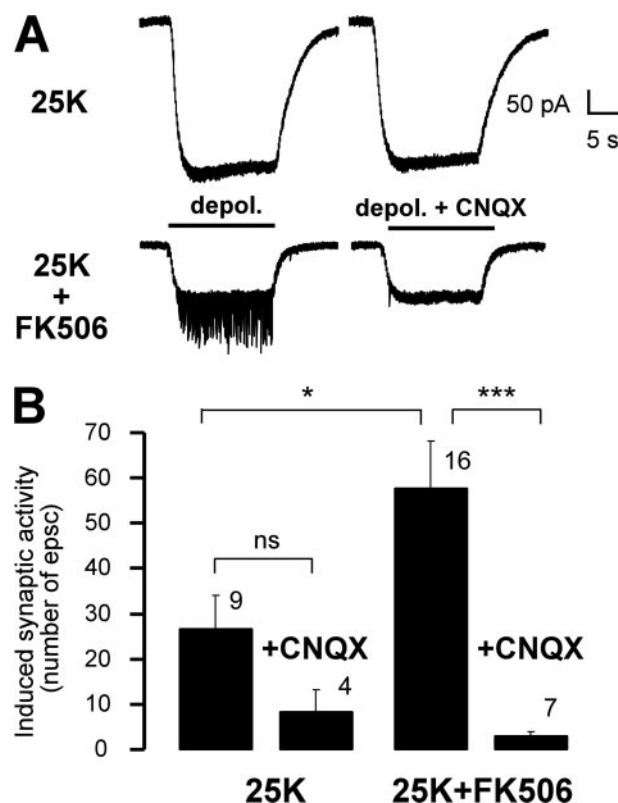


FIGURE 7. Influence of TASK-3 expression on neuronal excitability. *A*, left panel: current recorded in whole cell configuration, at -60 mV, upon acute perfusion with a depolarizing solution (depol.) in single neurons cultured in 25 mM K^+ (25K) or 25K + FK506, as indicated. *A*, right panel: same experiment with CNQX, in the same two neurons. *B*, means of the induced synaptic activity in 25K with or without FK506 and CNQX (number of EPSCs over 15 pA recorded in depolarizing solution for 10 s minus those recorded in control condition).

Moreover, we show a key role for the Ca^{2+} /calmodulin dependent phosphatase, calcineurin. The two calcineurin inhibitors FK506 and cyclosporin A, completely abolish the increase in TASK-3 mRNA, whereas an inhibitor of CaM kinases, KN93, is without effect. In CGNs, calcineurin has already been shown to play a fundamental role in the regulation of numerous genes (36, 37). While activation of calcineurin regulates genes implicated in the processes of cell proliferation, differentiation, migration, and neurite growth of immature granule cells in the EGL, inactivation of calcineurin is thought to predominantly up-regulate genes implicated in synaptic transmission in mature granule cells in the IGL (for review, see Ref. 24). This appears not to be the case for TASK-3, since its expression increases when calcineurin is active and as neurons mature. One of the best studied calcineurin targets is nuclear factor of activated T cell, a transcription factor that when dephosphorylated by calcineurin, translocates to the nucleus to activate gene expression (43). Recent studies suggest that calcineurin may also act on another important transcription regulator myocyte enhancer factor 2 (MEF2) that is also expressed in CGNs. MEF2 binds to DNA in its hypophosphorylated form and calcineurin enhances the MEF2 binding activity by maintaining the protein in this state (44–46). However, in our hands, dominant-positive forms of the nuclear factor of activated T cell (47) and MEF2 (48) were unable to increase TASK-3 expression in CGNs (data not shown). Future studies will be required to determine exactly how calcineurin regulates TASK-3 expression.

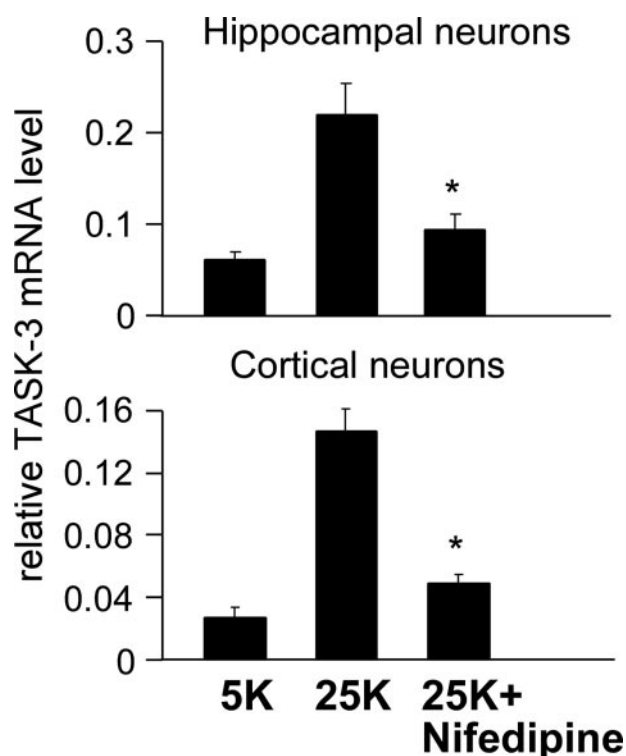


FIGURE 8. KCl-induced depolarization increases TASK-3 mRNA in fetal rat hippocampal and cortical neurons. Neurons were isolated from fetal rat hippocampus and cortex and maintained in 5K, 25K, or 25K + nifedipine for 48 h. The corresponding RNAs were isolated and TASK-3 mRNA levels were assessed by quantitative PCR. Data were normalized to the level of cyclophilin D. Each data point represents the mean \pm S.E. of three experiments. *, $p < 0.01$ in comparison with the TASK-3 mRNA level in 25K.

Interestingly, the expression of both TASK-1 and TASK-3 mRNAs is regulated by calcium. Whereas the level of TASK-3 mRNA is increased by calcium, the level of TASK-1 mRNA is reduced. These findings may explain the differences observed between CGNs grown in high K⁺ (10, 17, 18) and cultures grown in physiological concentrations of K⁺ in the presence of growth factors and after a short stimulation of glutamate (16, 49). In the latter papers both homomeric TASK-3 channels and heteromeric TASK-1/-3 channels contribute to IK_{so}. In high K⁺, TASK-3 homomers are largely the main contributors to IK_{so}, in accordance with an increased TASK-3 and a decreased TASK-1 mRNA expression. The calcium-dependent transcriptional regulation of these channel subunits would give CGNs the facility to regulate the relative levels of hetero- and homomeric channels with their distinct sensitivities to pH changes and neurotransmitter responses (19). While, the temporal profile of TASK-3 mRNA expression in CGNs *in vitro* follows that observed *in vivo*, this is not the case for TASK-1. TASK-1 mRNA is reduced in neurons cultured in high K⁺, while it is increased *in vivo* during cerebellar development (17, 50). A similar situation is observed with the GABA_A receptor (51). The expression of both the $\alpha 1$ and $\alpha 6$ receptor subunits increase during cerebellar development in parallel with the establishment of synaptic contacts in the internal granule layer. However, K⁺-induced calcium entry in cultured neurons only increases the $\alpha 1$ subunit mRNA (51).

The calcineurin inhibitor FK506 potently blocks TASK-3 transcription and as a consequence diminishes IK_{so}. Since IK_{so}

is a key determinant of CGN excitability (4), the electrical properties of CGNs grown in culture conditions favoring expression of high levels of TASK-3 were compared with those grown in the presence of FK506. 8–9 days *in vitro* CGNs display hyperpolarized resting membrane potentials (about -70 mV) and are electrically silent. It requires a depolarizing stimulus (see “Experimental Procedures”) for some CNQX-sensitive EPSCs to be recorded. On the other hand, cells grown in high K⁺ and FK506 are more depolarized (about -40 mV) and are highly sensitive to a depolarizing stimulus. Taken together, these results demonstrate a close correlation between the Ca²⁺-dependent activation of calcineurin and the expression of IK_{so} leading to a change in CGN excitability. Indeed, the importance of IK_{so} in adaptive regulation of excitability was divulged in a knock-out mouse model of the GABA_A $\alpha 6$ receptor subunit (50), wherein the removal of a tonic inhibitory conductance leads to a long term increase in the leak conductance IK_{so} (50). Interestingly, recent work on a mouse knock-out model of TASK-1 demonstrated that the lack of TASK-1 did not affect the resting membrane potential of CGNs and that the IK_{so} conductance was carried by TASK-3 homomeric channels (18). In the future it will be important to determine the electrical properties of CGNs derived from TASK-3 and TASK-1/TASK-3 knock-out mice.

The physiological importance of TASK-like background activity has clearly been demonstrated in several neuronal subtypes besides cerebellar granule neurons, such as thalamocortical neurons (52), hypoglossal motoneurons (53), brainstem motoneurons (54), and serotonergic raphe neurons (31). For example, in thalamocortical relay neurons, TASK channels control activity modes during the sleep-wake cycle (52). In motoneurons and aminergic brainstem neurons, the immobilizing and soporific effects of anesthetics have been attributed to anesthetic activation of TASK channels (54–56). In serotonergic raphe neurons, the pH-dependent inhibition of IK_{so} channels has been suggested to contribute to ventilatory and arousal reflexes associated with extracellular acidosis (31). TASK channels are also thought to underlie the oxygen-sensitive background K⁺ channel in the chemoreceptor carotid body Type I cells (34, 42). Hypoxic inhibition of TASK currents and subsequent depolarization of these oxygen-sensing cells signals the respiratory center in the brainstem, leading to a reflex increase in breathing (34). In all cases, the fine tuning of these channels are key elements in the regulation of neuronal excitability.

Our work reveals a new and important mechanism for the control of the leak K⁺ conductance IK_{so}. This is the first study demonstrating that depolarization-induced Ca²⁺ entry can, via calcineurin, directly regulate cellular excitability by dynamically regulating the transcription of a resting K⁺ conductance. Future work will determine what significance Ca²⁺-dependent transcriptional regulation of TASK-3 has *in vivo*.

Acknowledgments—We thank Dr. E. Honoré for critical comments and fruitful discussion during this study, Martine Jodar for excellent technical assistance, and Ron Prywes for providing the dominant-positive of MEF2 and Anjana Rao for the dominant-positive of the nuclear factor of activated T cell.

REFERENCES

- Ross, C. A., Bretz, D., and Snyder, S. H. (1990) *Trends Neurosci.* **13**, 216–222
- Voogd, J., and Glickstein, M. (1998) *Trends Neurosci.* **21**, 370–375
- Herrup, K., and Kuemerle, B. (1997) *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 61–90
- Watkins, C. S., and Mathie, A. (1996) *J. Physiol. (Lond.)* **492**, 401–412
- Mathie, A., Clarke, C. E., Ranatunga, K. M., and Veale, E. L. (2003) *Cerebellum* **2**, 11–25
- Takayasu, Y., Iino, M., Furuya, N., and Ozawa, S. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 6200–6208
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 5464–5471
- Leonoudakis, D., Gray, A. T., Winegar, B. D., Kindler, C. H., Harada, M., Taylor, D. M., Chavez, R. A., Forsayeth, J. R., and Yost, C. S. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 868–877
- Kim, Y., Bang, H., and Kim, D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9340–9347
- Millar, J. A., Barratt, L., Southan, A. P., Page, K. M., Fyffe, R. E., Robertson, B., and Mathie, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3614–3618
- Patel, A. J., and Lazdunski, M. (2004) *Pfluegers Arch.* **448**, 261–273
- Talley, E. M., Lei, Q., Sirois, J. E., and Bayliss, D. A. (2000) *Neuron* **25**, 399–410
- Czirjak, G., Petheo, G. L., Spat, A., and Enyedi, P. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, C700–C708
- Czirjak, G., and Enyedi, P. (2002) *Mol. Endocrinol.* **16**, 621–629
- Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2003) *EMBO J.* **22**, 5403–5411
- Han, J., Truell, J., Gnatenco, C., and Kim, D. (2002) *J. Physiol. (Lond.)* **542**, 431–444
- Lauritzen, I., Zanzouri, M., Honore, E., Duprat, F., Ehrenguber, M. U., Lazdunski, M., and Patel, A. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32068–32076
- Aller, M. I., Veale, E. L., Linden, A. M., Sandu, C., Schwaninger, M., Evans, L. J., Korpi, E. R., Mathie, A., Wisden, W., and Brickley, S. G. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 11455–11467
- Czirjak, G., and Enyedi, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5426–5432
- Czirjak, G., and Enyedi, P. (2003) *Mol. Pharmacol.* **63**, 646–652
- Clarke, C. E., Veale, E. L., Green, P. J., Meadows, H. J., and Mathie, A. (2004) *J. Physiol. (Lond.)* **560**, 51–62
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R., and Jorgensen, O. S. (1987) *J. Neurosci.* **7**, 2203–2213
- Bessho, Y., Nawa, H., and Nakanishi, S. (1994) *Neuron* **12**, 87–95
- Nakanishi, S., and Okazawa, M. (2006) *J. Physiol. (Lond.)*, in press
- Balazs, R., Gallo, V., and Kingsbury, A. (1988) *Brain Res.* **468**, 269–276
- Resink, A., Villa, M., Benke, D., Mohler, H., and Balazs, R. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 558–565
- Resink, A., Villa, M., Boer, G. J., Mohler, H., and Balazs, R. (1995) *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1700–1706
- Gault, L. M., and Siegel, R. E. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 2391–2399
- Engblom, A. C., Johansen, F. F., and Kristiansen, U. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16543–16550
- Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., and Bayliss, D. A. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 7491–7505
- Washburn, C. P., Sirois, J. E., Talley, E. M., Guyenet, P. G., and Bayliss, D. A. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 1256–1265
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996) *EMBO J.* **15**, 6400–6407
- Laurie, D. J., Wisden, W., and Seeburg, P. H. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 4151–4172
- Buckler, K., Williams, B., and Honoré, E. (2000) *J. Physiol. (Lond.)* **525**, 135–142
- Carafoli, E., Genazzani, A., and Guerini, D. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 624–632
- Kramer, D., Fresu, L., Ashby, D. S., Freeman, T. C., and Genazzani, A. A. (2003) *Mol. Cell. Neurosci.* **23**, 325–330
- Sato, M., Suzuki, K., Yamazaki, H., and Nakanishi, S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5874–5879
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) *Cell* **66**, 807–815
- Marley, P. D., and Thomson, K. A. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 15–18
- Lossi, L., Mioletti, S., and Merighi, A. (2002) *Neuroscience* **112**, 509–523
- Mellor, J. R., and Randall, A. D. (1998) *J. Physiol. (Lond.)* **506**, 377–390
- Buckler, K. J. (1997) *J. Physiol. (Lond.)* **498**, 649–662
- Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1992) *Nature* **357**, 695–697
- Mao, Z., and Wiedmann, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31102–31107
- Olson, E. N., and Williams, R. S. (2000) *BioEssays* **22**, 510–519
- Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R., and Chatila, T. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 197–209
- Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Rao, A. (2002) *Cell* **109**, 719–731
- Han, T. H., and Prywes, R. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2907–2915
- Kang, D., Han, J., Talley, E. M., Bayliss, D. A., and Kim, D. (2004) *J. Physiol. (Lond.)* **554**, 64–77
- Brickley, S. G., Revilla, V., Cull-Candy, S. G., Wisden, W., and Farrant, M. (2001) *Nature* **409**, 88–92
- Zheng, T., Santi, M.-R., Bovolenta, P., Marlier, L. N.-L., and Grayson, D. R. (1993) *Dev. Brain Res.* **75**, 91–103
- Meuth, S. G., Budde, T., Kanyshkova, T., Broicher, T., Munsch, T., and Pape, H. C. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 6460–6469
- Berg, A. P., Talley, E. M., Manger, J. P., and Bayliss, D. A. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 6693–6702
- Sirois, J. E., Lynch, C., 3rd, and Bayliss, D. A. (2002) *J. Physiol. (Lond.)* **541**, 717–729
- Sirois, J. E., Lei, Q., Talley, E. M., Lynch, C., III, and Bayliss, D. A. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 6347–6354
- Talley, E. M., and Bayliss, D. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 17733–17742

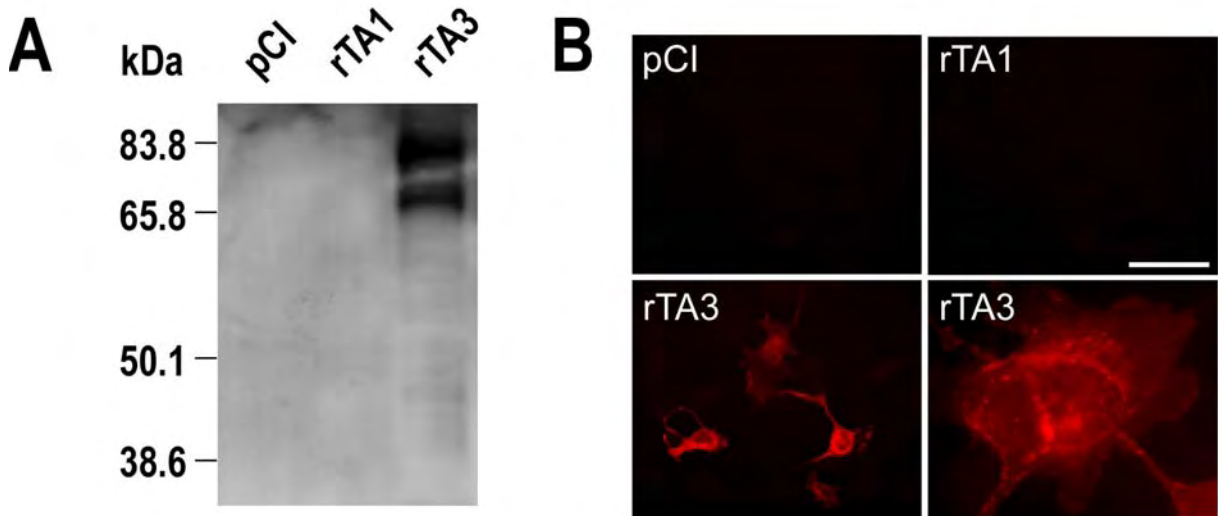
SUPPLEMENTARY INFORMATION

The following primers were used for Quantitative PCR:

rTASK-1 for: 5'-CGGCTTCCGCAACGTCTAT-3'
 rTASK-1 rev: 5'-TTGTACCAGAGGCACGAGCA-3'
 rTASK-3 for: 5'-GACGTGCTGAGGAACACCTACTT-3'
 rTASK-3 rev: 5'-GTGTGCATTCCAGGAGGGA-3'
 rTREK-1 for: 5'-GCCAATGTCACAGCCGAGT-3'
 rTREK-1 rev: 5'-GGCACGCTGGAACCTTGTCAT-3'
 rTREK-2 for: 5'-CCGGAATTACTCTCTGGATGAAGA-3'
 rTREK-2 rev: 5'-CATGGCTGTGCTGGAGTTGT-3'
 rTWIK-1 for: 5'-TGCTCTCCACCACAGGCTATG-3'
 rTWIK-1 rev: 5'-GTGAACGGGATGCCAATGAC-3'
 rGABA_A alpha6 for: 5'-AGCTGTATGCTTTGCGTTTGTC-3'
 rGABA_A alpha6 rev: 5'-TGGGACTGGAGATTGGTGAAGT-3'
 Cyclophilin D for: 5'-GGCTCTTGAAATGGACCCTTC-3'
 Cyclophilin D rev: 5'-CAGCCAATGCTTGATCATATTCTT-3'.

Supplementary Figure. Characterization of anti-TASK-3 antibody. A, Anti-TASK-3 specifically detects a duplex in lysates from COS cells transfected with rTASK-3, while no bands were detected in the control conditions. B, Immunocytochemistry on COS cells transfected with the rTASK-3 subunit. Only cells expressing rTASK-3 were labeled, while cells transfected with the TASK-1 subunit or the vector alone were not fluorescent.

Supplementary Figure



8 Références bibliographiques

- Abbott FV, Hong Y, Franklin KB. The effect of lesions of the dorsolateral funiculus on formalin pain and morphine analgesia: a dose-response analysis. *Pain* 1996;65(1):17-23.
- Adams CM, Snyder PM, Price MP, Welsh MJ. Protons activate brain Na⁺ channel 1 by inducing a conformational change that exposes a residue associated with neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(46):30204-30207.
- Adams DJ, Smith AB, Schroeder CI, Yasuda T, Lewis RJ. Omega-conotoxin CVID inhibits a pharmacologically distinct voltage-sensitive calcium channel associated with transmitter release from preganglionic nerve terminals. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(6):4057-4062.
- Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM. Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 1993;32(47):12566-12570.
- Afridi SK, Giffin NJ, Kaube H, Friston KJ, Ward NS, Frackowiak RS, Goadsby PJ. A positron emission tomographic study in spontaneous migraine. *Arch Neurol* 2005;62(8):1270-1275.
- Aimone LD, Gebhart GF. Stimulation-produced spinal inhibition from the midbrain in the rat is mediated by an excitatory amino acid neurotransmitter in the medial medulla. *J Neurosci* 1986;6(6):1803-1813.
- Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN. A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* 2000;11(10):2217-2222.
- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 1996;379(6562):257-262.
- Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature neuroscience* 1999;2(6):541-548.
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *Embo J* 2006;25(11):2368-2376.
- Altier C, Zamponi GW. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends in pharmacological sciences* 2004;25(9):465-470.
- Alvarez de la Rosa D, Krueger SR, Kolar A, Shao D, Fitzsimonds RM, Canessa CM. Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 2003;546(Pt 1):77-87.
- Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Shao D, White F, Canessa CM. Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(4):2326-2331.
- Amanzio M, Benedetti F. Neuropharmacological dissection of placebo analgesia: expectation-activated opioid systems versus conditioning-activated specific subsystems. *J Neurosci* 1999;19(1):484-494.
- Amanzio M, Pollo A, Maggi G, Benedetti F. Response variability to analgesics: a role for non-specific activation of endogenous opioids. *Pain* 2001;90(3):205-215.

- Askwith CC, Benson CJ, Welsh MJ, Snyder PM. DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(11):6459-6463.
- Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, Welsh MJ. Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 2000;26(1):133-141.
- Babini E, Paukert M, Geisler HS, Grunder S. Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *The Journal of biological chemistry* 2002;277(44):41597-41603.
- Babinski K, Le KT, Seguela P. Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J Neurochem* 1999;72(1):51-57.
- Bailey A, Matthes H, Kieffer B, Slowe S, Hourani SM, Kitchen I. Quantitative autoradiography of adenosine receptors and NBTI-sensitive adenosine transporters in the brains and spinal cords of mice deficient in the mu-opioid receptor gene. *Brain research* 2002;943(1):68-79.
- Baker MD, Wood JN. Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. *Trends in pharmacological sciences* 2001;22(1):27-31.
- Ballet S, Mauborgne A, Gouarderes C, Bourgoin AS, Zajac JM, Hamon M, Cesselin F. The neuropeptide FF analogue, 1DME, enhances in vivo met-enkephalin release from the rat spinal cord. *Neuropharmacology* 1999;38(9):1317-1324.
- Barbry P, Hofman P. Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1):G571-585.
- Baron A, Deval E, Salinas M, Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *The Journal of biological chemistry* 2002a;277(52):50463-50468.
- Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M. Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(38):35361-35367.
- Baron A, Waldmann R, Lazdunski M. ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 2002b;539(Pt 2):485-494.
- Barrett CF, Cao YQ, Tsien RW. Gating deficiency in a familial hemiplegic migraine type 1 mutant P/Q-type calcium channel. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(25):24064-24071.
- Barton ME, Eberle EL, Shannon HE. The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *European journal of pharmacology* 2005;521(1-3):79-85.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 1978;4(5):451-462.
- Bassilana F, Champigny G, Waldmann R, de Weille JR, Heurteaux C, Lazdunski M. The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(46):28819-28822.
- Bassler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, Grunder S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(36):33782-33787.
- Beedle AM, McRory JE, Poirot O, Doering CJ, Altier C, Barrere C, Hamid J, Nargeot J, Bourinet E, Zamponi GW. Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nature neuroscience* 2004;7(2):118-125.

- Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D. Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* 2004;41(1):127-138.
- Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL. Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. *The European journal of neuroscience* 2006;23(8):2057-2066.
- Benbouzid M, Gaveriaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barrot M. Delta-Opioid Receptors Are Critical for Tricyclic Antidepressant Treatment of Neuropathic Allodynia. *Biol Psychiatry* 2007.
- Benedetti F, Arduino C, Amanzio M. Somatotopic activation of opioid systems by target-directed expectations of analgesia. *J Neurosci* 1999;19(9):3639-3648.
- Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW. Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* 1999;84(8):921-928.
- Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, Snyder PM. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(4):2338-2343.
- Benveniste M, Dingledine R. Limiting stroke-induced damage by targeting an acid channel. *The New England journal of medicine* 2005;352(1):85-86.
- Besson JM, Chaouch A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 1987;67(1):67-186.
- Bessou P, Perl ER. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of neurophysiology* 1969;32(6):1025-1043.
- Bevan S, Yeats J. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1991;433:145-161.
- Blair NT, Bean BP. Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci* 2002;22(23):10277-10290.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 2000;408(6813):720-723.
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 2002;8(2):136-142.
- Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* 2005;24(2):315-324.
- Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(4):1486-1491.
- Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang YX, Luther RR. Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1996;279(3):1243-1249.
- Brumovsky PR, Bergman E, Liu HX, Hokfelt T, Villar MJ. Effect of a graded single constriction of the rat sciatic nerve on pain behavior and expression of immunoreactive NPY and NPY Y1 receptor in DRG neurons and spinal cord. *Brain research* 2004;1006(1):87-99.
- Burnstock G. P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth* 2000;84(4):476-488.

- Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends in pharmacological sciences* 2001;22(4):182-188.
- Bushnell MC, Duncan GH, Hofbauer RK, Ha B, Chen JI, Carrier B. Pain perception: is there a role for primary somatosensory cortex? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(14):7705-7709.
- Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ES, Ballard A, McMahon SB, McNaughton PA. Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J Neurosci* 2007;27(48):13251-13260.
- Cain CK, Francis JM, Plone MA, Emerich DF, Lindner MD. Pain-related disability and effects of chronic morphine in the adjuvant-induced arthritis model of chronic pain. *Physiology & behavior* 1997;62(1):199-205.
- Calcutt NA, Chaplan SR. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1997;122(7):1478-1482.
- Campbell JN, Meyer RA, LaMotte RH. Sensitization of myelinated nociceptive afferents that innervate monkey hand. *Journal of neurophysiology* 1979;42(6):1669-1679.
- Cao YQ, Tsien RW. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca^{2+} channel activity and inhibitory synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(7):2590-2595.
- Casey KL. The imaging of pain : background and rational. In: KL Casey, MC Bushnell, editors|. Book Title|, Vol. Volume|. City|: Publisher|, Year|. p.^pp. Pages|.
- Castellucci V, Kandel ER. Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science (New York, NY)* 1976;194(4270):1176-1178.
- Catarsi S, Babinski K, Seguela P. Selective modulation of heteromeric ASIC proton-gated channels by neuropeptide FF. *Neuropharmacology* 2001;41(5):592-600.
- Caterina MJ, Julius D. Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(5):525-530.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, NY)* 2000;288(5464):306-313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389(6653):816-824.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26(1):13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews* 2005a;57(4):397-409.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* 2005b;57(4):411-425.
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacological reviews* 2003;55(4):579-581.
- Cesare P, McNaughton P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(26):15435-15439.

- Chagot B, Escoubas P, Diochot S, Bernard C, Lazdunski M, Darbon H. Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein Sci* 2005;14(8):2003-2010.
- Chalfie M, Au M. Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science (New York, NY 1989;243(4894 Pt 1):1027-1033.*
- Chalfie M, Sulston J. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1981;82(2):358-370.
- Champigny G, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M. Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(25):15418-15422.
- Chandran P, Sluka KA. Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. *Pain* 2003;102(1-2):195-201.
- Chang L, Berman S, Mayer EA, Suyenobu B, Derbyshire S, Naliboff B, Vogt B, FitzGerald L, Mandelkern MA. Brain responses to visceral and somatic stimuli in patients with irritable bowel syndrome with and without fibromyalgia. *Am J Gastroenterol* 2003;98(6):1354-1361.
- Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 1971;232(29):86-87.
- Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1994;269(3):1117-1123.
- Chelur DS, Ernstrom GG, Goodman MB, Yao CA, Chen L, R OH, Chalfie M. The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel. *Nature* 2002;420(6916):669-673.
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995;377(6548):428-431.
- Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(17):10240-10245.
- Chen CC, Rainville P, Bushnell MC. Noxious and innocuous cold discrimination in humans: evidence for separate afferent channels. *Pain* 1996;68(1):33-43.
- Chen CC, Zimmer A, Sun WH, Hall J, Brownstein MJ, Zimmer A. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(13):8992-8997.
- Chen JC, Smith ER, Cahill M, Cohen R, Fishman JB. The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life sciences* 1993;52(4):389-396.
- Chen X, Kalbacher H, Grunder S. The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *The Journal of general physiology* 2005;126(1):71-79.
- Chen X, Kalbacher H, Grunder S. Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. *The Journal of general physiology* 2006a;127(3):267-276.
- Chen X, Paukert M, Kadurin I, Pusch M, Grunder S. Strong modulation by RFamide neuropeptides of the ASIC1b/3 heteromer in competition with extracellular calcium. *Neuropharmacology* 2006b;50(8):964-974.

- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS letters* 1994;347(2-3):279-283.
- Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C, Prinssen EP. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Current drug targets* 2007;8(1):117-135.
- Chronwall BM, Zukowska Z. Neuropeptide Y, ubiquitous and elusive. *Peptides* 2004;25(3):359-363.
- Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, Simon RP, Xiong ZG. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2004;24(40):8678-8689.
- Chung MK, Lee H, Caterina MJ. Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(34):32037-32046.
- Cizkova D, Marsala J, Lukacova N, Marsala M, Jergova S, Orendacova J, Yaksh TL. Localization of N-type Ca²⁺ channels in the rat spinal cord following chronic constrictive nerve injury. *Exp Brain Res* 2002;147(4):456-463.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426(6966):517-524.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 2000;407(6807):1011-1015.
- Coghill RC, Talbot JD, Evans AC, Meyer E, Gjedde A, Bushnell MC, Duncan GH. Distributed processing of pain and vibration by the human brain. *J Neurosci* 1994;14(7):4095-4108.
- Coric T, Zhang P, Todorovic N, Canessa CM. The extracellular domain determines the kinetics of desensitization in acid-sensitive ion channel 1. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(46):45240-45247.
- Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem* 2004;271(10):1814-1819.
- Coryell MW, Ziemann AE, Westmoreland PJ, Haenfler JM, Kurjakovic Z, Zha XM, Price M, Schnizler MK, Wemmie JA. Targeting ASIC1a Reduces Innate Fear and Alters Neuronal Activity in the Fear Circuit. *Biol Psychiatry* 2007;62(10):1140-1148.
- Coscoy S, de Weille JR, Lingueglia E, Lazdunski M. The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(15):10129-10132.
- Coscoy S, Lingueglia E, Lazdunski M, Barbry P. The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(14):8317-8322.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424(6951):938-942.
- Coupar IM, Tran BL. Withdrawal and bidirectional cross-withdrawal responses in rats treated with adenosine agonists and morphine. *Life sciences* 2001;69(7):779-790.
- Cousins M, Poweer I. Acute and postoperative pain. In: PD Wall, R Melzack, editors|. Book Title|, Vol. Volume|. City|: Publisher|, Year|. p.^pp. Pages|.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 2006;444(7121):894-898.

- Craft RM, Lee DA. NMDA antagonist modulation of morphine antinociception in female vs. male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80(4):639-649.
- Craig AD. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(8):655-666.
- Craig AD. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:1-30.
- Craig AD, Bushnell MC, Zhang ET, Blomqvist A. A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature* 1994;372(6508):770-773.
- Craig AD, Chen K, Bandy D, Reiman EM. Thermosensory activation of insular cortex. *Nature neuroscience* 2000;3(2):184-190.
- Craig AD, Reiman EM, Evans A, Bushnell MC. Functional imaging of an illusion of pain. *Nature* 1996;384(6606):258-260.
- Craik DJ, Daly NL, Waine C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 2001;39(1):43-60.
- Cummins TR, Aglieco F, Renganathan M, Herzog RI, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. *J Neurosci* 2001;21(16):5952-5961.
- Cummins TR, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Electrophysiological properties of mutant Nav1.7 sodium channels in a painful inherited neuropathy. *J Neurosci* 2004;24(38):8232-8236.
- Cummins TR, Waxman SG. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 1997;17(10):3503-3514.
- Davies JE, Marsden CA, Roberts MH. Hyperalgesia and the reduction of monoamines resulting from lesions of the dorsolateral funiculus. *Brain research* 1983;261(1):59-68.
- Davis MD, Sandroni P, Rooke TW, Low PA. Erythromelalgia: vasculopathy, neuropathy, or both? A prospective study of vascular and neurophysiologic studies in erythromelalgia. *Arch Dermatol* 2003;139(10):1337-1343.
- De Koninck Y. Transmission nerveuse de la douleur : mécanismes endogènes de contrôle au niveau spinal. *Médecine & Science* 1997;13:542-548.
- de Weille J, Bassilana F. Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca(2+) ions. *Brain research* 2001;900(2):277-281.
- Defrin R, Ohry A, Blumen N, Urca G. Sensory determinants of thermal pain. *Brain* 2002;125(Pt 3):501-510.
- Denuelle M. Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache* 2007.
- Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 2003;44(5):662-671.
- Devillers JP, Labrousse SA, Castes E, Simonnet G. Release of neuropeptide FF, an anti-opioid peptide, in rat spinal cord slices is voltage- and Ca(2+)-sensitive: possible involvement of P-type Ca2+ channels. *J Neurochem* 1995;64(4):1567-1575.
- Diamond J, Mills LR, Mearow KM. Evidence that the Merkel cell is not the transducer in the mechanosensory Merkel cell-neurite complex. *Prog Brain Res* 1988;74:51-56.
- Dib-Hajj SD, Rush AM, Cummins TR, Hisama FM, Novella S, Tyrrell L, Marshall L, Waxman SG. Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* 2005;128(Pt 8):1847-1854.
- Ding Y, Cesare P, Drew L, Nikitaki D, Wood JN. ATP, P2X receptors and pain pathways. *J Auton Nerv Syst* 2000;81(1-3):289-294.

- Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *Embo J* 2004;23(7):1516-1525.
- Diochot S, Salinas M, Baron A, Escoubas P, Lazdunski M. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 2007;49(2):271-284.
- Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003;105(1-2):159-168.
- Doods H. Development of CGRP antagonists for the treatment of migraine. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(9):1261-1268.
- Dowd E, McQueen DS, Chessell IP, Humphrey PP. Adenosine A1 receptor-mediated excitation of nociceptive afferents innervating the normal and arthritic rat knee joint. *Br J Pharmacol* 1998;125(6):1267-1271.
- Dray A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75(6):704-712.
- Dray A, Bettaney J, Forster P. Actions of capsaicin on peripheral nociceptors of the neonatal rat spinal cord-tail in vitro: dependence of extracellular ions and independence of second messengers. *Br J Pharmacol* 1990;101(3):727-733.
- Dray A, Bevan S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends in pharmacological sciences* 1993;14(8):287-290.
- Drew LJ, Wood JN, Cesare P. Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and -insensitive sensory neurons. *J Neurosci* 2002;22(12):RC228.
- Driscoll M, Chalfie M. The mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 1991;349(6310):588-593.
- Duan B, Wu LJ, Yu YQ, Ding Y, Jing L, Xu L, Chen J, Xu TL. Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 2007;27(41):11139-11148.
- Edvinsson L. Functionnal role of perivascular peptides in the control of cerebral circulation. *Trends in Neurosciences* 1985;8:126-131.
- Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and the pathophysiology of headache: therapeutic implications. *CNS drugs* 2001;15(10):745-753.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000;25(3):533-535.
- Escoubas P, Bernard C, Lambeau G, Lazdunski M, Darbon H. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels. *Protein Sci* 2003;12(7):1332-1343.
- Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, Moinier D, Menez A, Lazdunski M. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(33):25116-25121.
- Ettaiche M, Deval E, Cougnon M, Lazdunski M, Voilley N. Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *J Neurosci* 2006;26(21):5800-5809.
- Ettaiche M, Guy N, Hofman P, Lazdunski M, Waldmann R. Acid-sensing ion channel 2 is important for retinal function and protects against light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2004;24(5):1005-1012.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science (New York, NY)* 1992;258(5090):1952-1955.

- Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 2002;22(17):7425-7433.
- Feng ZP, Doering CJ, Winkfein RJ, Beedle AM, Spafford JD, Zamponi GW. Determinants of inhibition of transiently expressed voltage-gated calcium channels by omega-conotoxins GVIA and MVIIA. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(22):20171-20178.
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacological reviews* 2007a;59(1):88-123.
- Fichna J, Janecka A, Piestrzeniewicz M, Costentin J, do Rego JC. Antidepressant-like effect of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice. *Neuropsychopharmacology* 2007b;32(4):813-821.
- Fields HL, Basbaum AI. Anatomy and physiology of a descending pain control system. In: BJ Bonica, editor *Book Title*, Vol. *Volume*. City: Publisher, Year. p. ^pp. Pages.
- Fields HL, Heinricher MM. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 1985;308(1136):361-374.
- Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *Embo J* 1996;15(24):6854-6862.
- Firsov D, Robert-Nicoud M, Gruender S, Schild L, Rossier BC. Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelium sodium channel (ENaC). Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(5):2743-2749.
- Fjell J, Hjelmstrom P, Hormuzdiar W, Milenkovic M, Aglieco F, Tyrrell L, Dib-Hajj S, Waxman SG, Black JA. Localization of the tetrodotoxin-resistant sodium channel NaN in nociceptors. *Neuroreport* 2000;11(1):199-202.
- Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109(1-2):150-161.
- Florenzano F, Viscomi MT, Cavaliere F, Volonte C, Molinari M. Cerebellar lesion up-regulates P2X1 and P2X2 purinergic receptors in precerebellar nuclei. *Neuroscience* 2002;115(2):425-434.
- Franks NP, Lieb WR. Volatile general anaesthetics activate a novel neuronal K⁺ current. *Nature* 1988;333(6174):662-664.
- Freeman TB, Campbell JN, Long DM. Naloxone does not affect pain relief induced by electrical stimulation in man. *Pain* 1983;17(2):189-195.
- Friedman DP, Murray EA. Thalamic connectivity of the second somatosensory area and neighboring somatosensory fields of the lateral sulcus of the macaque. *The Journal of comparative neurology* 1986;252(3):348-373.
- Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, Fugger L. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* 2007.
- Fukuizumi T, Ohkubo T, Kitamura K. Spinal sensitization mechanism in vincristine-induced hyperalgesia in mice. *Neuroscience letters* 2003;343(2):89-92.
- Gall O, Bouhassira D, Chitour D, Le Bars D. Involvement of the caudal medulla in negative feedback mechanisms triggered by spatial summation of nociceptive inputs. *Journal of neurophysiology* 1998;79(1):304-311.
- Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G, Trequattrini A, Palumbo R. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia* 1995;15(5):384-390.

- Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhang GY, Xu L, Xu TL. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* 2005;48(4):635-646.
- Garcia-Anoveros J, Corey DP. The molecules of mechanosensation. *Annu Rev Neurosci* 1997;20:567-594.
- Garcia-Anoveros J, Samad TA, Zuvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP. Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaCl α to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 2001;21(8):2678-2686.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(34):26128-26135.
- Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR. CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain* 2005;6(2):61-70.
- Geraud G, Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F. [Positron emission tomographic studies of migraine]. *Rev Neurol (Paris)* 2005;161(6-7):666-670.
- Gildenberg PL. Myelotomy through the years. *Stereotact Funct Neurosurg* 2001;77(1-4):169-171.
- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(15):8606-8611.
- Goadsby PJ. Calcitonin gene-related peptide antagonists as treatments of migraine and other primary headaches. *Drugs* 2005;65(18):2557-2567.
- Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 1994;117 (Pt 3):427-434.
- Goldberg JH, Lacefield CO, Yuste R. Global dendritic calcium spikes in mouse layer 5 low threshold spiking interneurons: implications for control of pyramidal cell bursting. *J Physiol* 2004;558(Pt 2):465-478.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;28(2):365-368.
- Goldscheider A. Über den Schmerz: physiologischer und klinischer Aspekt. Berlin: Hirschwald, 1894.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76(12):6666-6670.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 2000;20(22):RC110.
- Gomora JC, Murbartian J, Arias JM, Lee JH, Perez-Reyes E. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 2002;83(1):229-241.
- Goodman MB, Schwarz EM. Transducing touch in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* 2003;65:429-452.
- Grunder S, Geisler HS, Rainier S, Fink JK. Acid-sensing ion channel (ASIC) 4 gene: physical mapping, genomic organisation, and evaluation as a candidate for paroxysmal dystonia. *Eur J Hum Genet* 2001;9(9):672-676.

- Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppersberg JP. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 2000;11(8):1607-1611.
- Gullapalli S, Ramarao P. L-type Ca^{2+} channel modulation by dihydropyridines potentiates kappa-opioid receptor agonist induced acute analgesia and inhibits development of tolerance in rats. *Neuropharmacology* 2002;42(4):467-475.
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends in pharmacological sciences* 2002;23(4):183-191.
- Gutstein H, Akil H. Opioid analgesics. In: JG Hardman, LE Limbird, editors|. Book Title|, Vol. Volume|. City|: Publisher|, Year|. p.^pp. Pages|.
- Hackler L, Zadina JE, Ge LJ, Kastin AJ. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* 1997;18(10):1635-1639.
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(8):4687-4692.
- Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG. Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 2003;23(26):8881-8892.
- Han ZS, Zhang ET, Craig AD. Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nature neuroscience* 1998;1(3):218-225.
- Hans M, Luvisetto S, Williams ME, Spagnolo M, Urrutia A, Tottene A, Brust PF, Johnson EC, Harpold MM, Stauderman KA, Pietrobon D. Functional consequences of mutations in the human α_1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 1999;19(5):1610-1619.
- Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S. Differential nociceptive responses in mice lacking the α_1B subunit of N-type Ca^{2+} channels. *Neuroreport* 2001;12(11):2423-2427.
- Heinricher MM, Haws CM, Fields HL. Evidence for GABA-mediated control of putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla: iontophoresis of bicuculline eliminates the off-cell pause. *Somatosens Mot Res* 1991;8(3):215-225.
- Hesselager M, Timmermann DB, Ahring PK. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(12):11006-11015.
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, Lazdunski M. TREK-1, a K^{+} channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *Embo J* 2004;23(13):2684-2695.
- Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends in pharmacological sciences* 2000;21(7):244-246.
- Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ, Lines CR, Rapoport AM. Randomized controlled trial of an oral CGRP antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology* 2007.
- Hong K, Driscoll M. A transmembrane domain of the putative channel subunit MEC-4 influences mechanotransduction and neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 1994;367(6462):470-473.

- Honore E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(4):251-261.
- Honore E, Maingret F, Lazdunski M, Patel AJ. An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *Embo J* 2002;21(12):2968-2976.
- Honore E, Patel AJ, Chemin J, Suchyna T, Sachs F. Desensitization of mechano-gated K2P channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(18):6859-6864.
- Hord AH, Denson DD, Chalfoun AG, Azevedo MI. The effect of systemic zonisamide (Zonegran) on thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats with an experimental mononeuropathy. *Anesthesia and analgesia* 2003;96(6):1700-1706, table of contents.
- Hua XY, Wong S, Jinno S, Yaksh TL. Pharmacology of calcitonin gene related peptide release from sensory terminals in the rat trachea. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73(7):999-1006.
- Huang M, Chalfie M. Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1994;367(6462):467-470.
- Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L. Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life sciences* 1975a;16(12):1753-1758.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975b;258(5536):577-580.
- Hung KC, Wu HE, Mizoguchi H, Leitermann R, Tseng LF. Intrathecal treatment with 6-hydroxydopamine or 5,7-dihydroxytryptamine blocks the antinociception induced by endomorphin-1 and endomorphin-2 given intracerebroventricularly in the mouse. *J Pharmacol Sci* 2003;93(3):299-306.
- Ikeda I, Yamashita Y, Ono T, Ogawa H. Selective phototoxic destruction of rat Merkel cells abolishes responses of slowly adapting type I mechanoreceptor units. *J Physiol* 1994;479 (Pt 2):247-256.
- Imai K, Tatsumi H, Katayama Y. Mechanosensitive chloride channels on the growth cones of cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2000;97(2):347-355.
- Immke DC, McCleskey EW. Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nature neuroscience* 2001;4(9):869-870.
- Immke DC, McCleskey EW. Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade. *Neuron* 2003;37(1):75-84.
- Ishibashi K, Marumo F. Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(2):589-593.
- Issberner U, Reeh PW, Steen KH. Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? *Neuroscience letters* 1996;208(3):191-194.
- Jacobus WE, Taylor GJt, Hollis DP, Nunnally RL. Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused working rat hearts. *Nature* 1977;265(5596):756-758.
- Jahr H, van Driel M, van Osch GJ, Weinans H, van Leeuwen JP. Identification of acid-sensing ion channels in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337(1):349-354.
- Jain KK. An evaluation of intrathecal ziconotide for the treatment of chronic pain. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9(10):2403-2410.
- Janecka A, Fichna J, Janecki T. Opioid receptors and their ligands. *Current topics in medicinal chemistry* 2004;4(1):1-17.

- Jarvis SE, Barr W, Feng ZP, Hamid J, Zamponi GW. Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(46):44399-44407.
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 2007;449(7160):316-323.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hokfelt T. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 1995;15(12):8156-8166.
- Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 2004;24(48):10974-10979.
- Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999;399(6737):697-700.
- Jordan BA, Gomes I, Rios C, Filipovska J, Devi LA. Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Molecular pharmacology* 2003;64(6):1317-1324.
- Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R, Devi LA. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(1):343-348.
- Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends in pharmacological sciences* 2000;21(11):432-438.
- Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain* 2005;114(1-2):295-302.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413(6852):203-210.
- Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS. Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(26):15245-15250.
- Just S, Arndt K, Doods H. The role of CGRP and nicotinic receptors in centrally evoked facial blood flow changes. *Neuroscience letters* 2005;381(1-2):120-124.
- Kamiya T, Saitoh O, Yoshioka K, Nakata H. Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306(2):544-549.
- Kandel ER, Schwartz JH. *Principles of neural science*. New York: Elsevier Science Publishing, 1985.
- Kang D, Choe C, Kim D. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 2005;564(Pt 1):103-116.
- Kaplan GB, Leite-Morris KA, Sears MT. Alterations of adenosine A1 receptors in morphine dependence. *Brain research* 1994;657(1-2):347-350.
- Kastin AJ, Banks WA, Olson RD, Zadina JE. Novel concepts from novel peptides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;739:1-10.
- Kellenberger S, Hoffmann-Pochon N, Gautschi I, Schneeberger E, Schild L. On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na⁺ channel. *The Journal of general physiology* 1999;114(1):13-30.
- Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002;82(3):735-767.
- Keller M, Boissard C, Patiny L, Chung NN, Lemieux C, Mutter M, Schiller PW. Pseudoproline-containing analogues of morphiceptin and endomorphin-2: evidence

- for a cis Tyr-Pro amide bond in the bioactive conformation. *Journal of medicinal chemistry* 2001;44(23):3896-3903.
- Kenshalo DRJ, Douglas DK. The role of the cerebral cortex on the experience of pain. In: B Bromm, JE Desmet, editors|. *Book Title*|. Vol. *Volume*|. City|: *Publisher*|. Year|. p.^pp. Pages|.
- Kerr BJ, Souslova V, McMahon SB, Wood JN. A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. *Neuroreport* 2001;12(14):3077-3080.
- Khachaturian H, Lewis ME, Haber SN, Houghten RA, Akil H, Watson SJ. Prodynorphin peptide immunocytochemistry in rhesus monkey brain. *Peptides* 1985;6 Suppl 2:155-166.
- Khosravani H, Bladen C, Parker DB, Snutch TP, McRory JE, Zamponi GW. Effects of Cav3.2 channel mutations linked to idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol* 2005;57(5):745-749.
- Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 2001;87(1):3-11.
- Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ. Inhibition of mesencephalic morphine analgesia by methysergide in the medial ventral medulla of rats. *Physiology & behavior* 1992a;51(1):201-205.
- Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ. Serotonin receptor subtype antagonists in the medial ventral medulla inhibit mesencephalic opiate analgesia. *Brain research* 1992b;597(2):331-338.
- Kieffer BL. Opioid receptors: from genes to mice. *J Pain* 2000;1(3 Suppl):45-50.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(24):12048-12052.
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in neurobiology* 2002;66(5):285-306.
- Kim DS, Yoon CH, Lee SJ, Park SY, Yoo HJ, Cho HJ. Changes in voltage-gated calcium channel alpha(1) gene expression in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;96(1-2):151-156.
- King AE, Thompson SW, Urban L, Woolf CJ. An intracellular analysis of amino acid induced excitations of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord slice. *Neuroscience letters* 1988;89(3):286-292.
- Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HW, Kieffer B. Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain research* 1997;778(1):73-88.
- Knight YE, Bartsch T, Kaube H, Goadsby PJ. P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? *J Neurosci* 2002;22(5):RC213.
- Kolesnikov Y, Pasternak GW. Topical opioids in mice: analgesia and reversal of tolerance by a topical N-methyl-D-aspartate antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1999;290(1):247-252.
- Kosek E, Hansson P. Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects. *Pain* 1997;70(1):41-51.
- Kosterlitz HW, Hughes J. Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand. *Life sciences* 1975;17(1):91-96.

- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, Hering S, Striessnig J. Familial hemiplegic migraine mutations change $\alpha 1A$ Ca^{2+} channel kinetics. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(10):5586-5590.
- Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 2003;26(9):477-483.
- Krishtal OA, Marchenko SM, Obukhov AG. Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons. *Neuroscience* 1988;27(3):995-1000.
- Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnov SV. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain research* 1987;436(2):352-356.
- Krishtal OA, Pidoplichko VI. A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neuroscience letters* 1981a;24(3):243-246.
- Krishtal OA, Pidoplichko VI. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 1981b;6(12):2599-2601.
- Kuhar MJ. Histochemical localization of opiate receptors and opioid peptides. *Federation proceedings* 1978;37(2):153-157.
- Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F. Absence of modulation of the expressed calcium channel $\alpha 1G$ subunit by $\alpha 2\delta$ subunits. *J Physiol* 1999;516 (Pt 3):639-645.
- Lai J, Hunter JC, Porreca F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13(3):291-297.
- Lai J, Porreca F, Hunter JC, Gold MS. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:371-397.
- Lambert RC, Maulet Y, Mouton J, Beattie R, Volsen S, De Waard M, Feltz A. T-type Ca^{2+} current properties are not modified by Ca^{2+} channel β subunit depletion in nodose ganglion neurons. *J Neurosci* 1997;17(17):6621-6628.
- LaMotte RH, Campbell JN. Comparison of responses of warm and nociceptive C-fiber afferents in monkey with human judgments of thermal pain. *Journal of neurophysiology* 1978;41(2):509-528.
- Lang E, Novak A, Reeh PW, Handwerker HO. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *Journal of neurophysiology* 1990;63(4):887-901.
- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 2002;22(1):54-61.
- Lautenbacher S, Rollman GB. Possible deficiencies of pain modulation in fibromyalgia. *Clin J Pain* 1997;13(3):189-196.
- Lazarus LH, Ling N, Guillemin R. β -Lipotropin as a prohormone for the morphinomimetic peptides endorphins and enkephalins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976;73(6):2156-2159.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 1979a;6(3):283-304.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 1979b;6(3):305-327.
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 1999;19(6):1912-1921.
- Lembeck F. [Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord.]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1953;219(3):197-213.

- Leuranguer V, Bourinet E, Lory P, Nargeot J. Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* 1998;37(6):701-708.
- Lever IJ, Bradbury EJ, Cunningham JR, Adelson DW, Jones MG, McMahon SB, Marvizon JC, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J Neurosci* 2001;21(12):4469-4477.
- Levine JD, Gordon NC, Fields HL. The mechanism of placebo analgesia. *Lancet* 1978;2(8091):654-657.
- Lewin GR, Mendell LM. Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci* 1993;16(9):353-359.
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995;377(6548):432-435.
- Lewis T. Pain. New York, 1942.
- Leysen JE, Gommeren W, Niemegeers CJ. [3H]Sufentanil, a superior ligand for mu-opiate receptors: binding properties and regional distribution in rat brain and spinal cord. *European journal of pharmacology* 1983;87(2-3):209-225.
- Lilley S, LeTissier P, Robbins J. The discovery and characterization of a proton-gated sodium current in rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2004;24(5):1013-1022.
- Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 1987;330(6149):658-659.
- Ling N, Burgus R, Guillemin R. Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976;73(11):3942-3946.
- Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(24):17325-17329.
- Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M, Barbry P. Cloning of the amiloride-sensitive FMRamide peptide-gated sodium channel. *Nature* 1995;378(6558):730-733.
- Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, Lazdunski M. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(47):29778-29783.
- Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels: the low down. *Journal of neurophysiology* 2004;92(5):2633-2641.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977;267(5611):495-499.
- Lundeberg T, Bondesson L, Lundstrom V. Relief of primary dysmenorrhea by transcutaneous electrical nerve stimulation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985;64(6):491-497.
- Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides And Neurogenic Mechanisms In Oral And Periodontal Inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(2):82-98.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001;21(6):1868-1875.
- Lynn B. Capsaicin: actions on C fibre afferents that may be involved in itch. *Skin Pharmacol* 1992;5(1):9-13.
- Lynn B, Carpenter SE. Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. *Brain research* 1982;238(1):29-43.

- Mahinda TB, Taylor BK. Intrathecal neuropeptide Y inhibits behavioral and cardiovascular responses to noxious inflammatory stimuli in awake rats. *Physiology & behavior* 2004;80(5):703-711.
- Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *Embo J* 2000;19(11):2483-2491.
- Majane EA, Yang HY. Distribution and characterization of two putative endogenous opioid antagonist peptides in bovine brain. *Peptides* 1987;8(4):657-662.
- Malmberg AB, Hedner T, Fallgren B, Calcutt NA. The effect of alpha-trinositol (D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate) on formalin-evoked spinal amino acid and prostaglandin E2 levels. *Brain research* 1997;747(1):160-164.
- Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2002;22(24):10662-10670.
- Mamet J, Lazdunski M, Voilley N. How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(49):48907-48913.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 1995;18(1):22-29.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science (New York, NY)* 1997;278(5336):275-279.
- Mao J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. *Pain* 2002;100(3):213-217.
- Marchand S. Le phénomène de la douleur. Montréal et Paris: Chenelière / McGraw-Hill et Masson, 1998.
- Marchand S, Kupers RC, Bushnell MC, Duncan GH. Analgesic and placebo effects of thalamic stimulation. *Pain* 2003;105(3):481-488.
- Marchand S, Li J, Charest J. Effects of caffeine on analgesia from transcutaneous electrical nerve stimulation. *The New England journal of medicine* 1995;333(5):325-326.
- Martin R, Voigt KH. Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature* 1981;289(5797):502-504.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *The Journal of comparative neurology* 1999;405(4):450-471.
- Martin-Schild S, Zadina JE, Gerall AA, Vigh S, Kastin AJ. Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides* 1997;18(10):1641-1649.
- Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, Kung C. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(8):2297-2301.
- Matsuki A. Nothing new under the sun--a Japanese pioneer in the clinical use of intrathecal morphine. *Anesthesiology* 1983;58(3):289-290.
- Mazurek N, Weskamp G, Erne P, Otten U. Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels. *FEBS letters* 1986;198(2):315-320.
- Mazzuca M, Lesage F. [Potassium channels, genetic and acquired diseases]. *La Revue de medecine interne / fondee* 2007;28(8):576-579.

- Mazzuca M, Lesage F, Lazdunski M. Ion channels and epilepsy. *Epileptic Disorders* 2006;8(S1):1-16.
- McCarter GC, Reichling DB, Levine JD. Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience letters* 1999;273(3):179-182.
- McGowan MK, Hammond DL. Antinociception produced by microinjection of L-glutamate into the ventromedial medulla of the rat: mediation by spinal GABAA receptors. *Brain research* 1993a;620(1):86-96.
- McGowan MK, Hammond DL. Intrathecal GABAB antagonists attenuate the antinociception produced by microinjection of L-glutamate into the ventromedial medulla of the rat. *Brain research* 1993b;607(1-2):39-46.
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002;416(6876):52-58.
- Melzack R, Torgerson WS. On the language of pain. *Anesthesiology* 1971;34(1):50-59.
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science (New York, NY)* 1965;150(699):971-979.
- Meunier JC. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *European journal of pharmacology* 1997;340(1):1-15.
- Meyer RA, Campbell JN, Raja SN. Peripheral neural mechanisms of nociception. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1994.
- Miljanich GP. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 2004;11(23):3029-3040.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology* 1999;57(1):1-164.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in neurobiology* 2002;66(6):355-474.
- Mitchell JM, Lowe D, Fields HL. The contribution of the rostral ventromedial medulla to the antinociceptive effects of systemic morphine in restrained and unrestrained rats. *Neuroscience* 1998;87(1):123-133.
- Mochida S, Yokoyama CT, Kim DK, Itoh K, Catterall WA. Evidence for a voltage-dependent enhancement of neurotransmitter release mediated via the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(24):14523-14528.
- Mogil JS, Grisel JE. Transgenic studies of pain. *Pain* 1998;77(2):107-128.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS letters* 1994;341(1):33-38.
- Morin C, Bushnell MC, Luskin MB, Craig AD. Disruption of thermal perception in a multiple sclerosis patient with central pain. *Clin J Pain* 2002;18(3):191-195.
- Morin-Surun MP, Boudinot E, Dubois C, Matthes HW, Kieffer BL, Denavit-Saubie M, Champagnat J, Foutz AS. Respiratory function in adult mice lacking the mu-opioid receptor: role of delta-receptors. *The European journal of neuroscience* 2001;13(9):1703-1710.
- Morinville A, Cahill CM, Kieffer B, Collier B, Beaudet A. Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain* 2004;109(3):266-273.
- Mork C, Kalkgaard OM, Kvernebo K. Impaired neurogenic control of skin perfusion in erythromelalgia. *J Invest Dermatol* 2002;118(4):699-703.
- Mousa SA, Machelska H, Schafer M, Stein C. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 2002;126(1-2):5-15.

- Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh, II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T, Iijima T. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha 1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain research* 2004;1024(1-2):122-129.
- Nahm SS, Jung KY, Enger MK, Griffith WH, Abbott LC. Differential expression of T-type calcium channels in P/Q-type calcium channel mutant mice with ataxia and absence epilepsy. *J Neurobiol* 2005;62(3):352-360.
- Nakamura F, Strittmatter SM. P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(19):10465-10470.
- Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, Wood JN. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(34):12706-12711.
- Naveilhan P, Hassani H, Lucas G, Blakeman KH, Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Thoren P, Ernfors P. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. *Nature* 2001;409(6819):513-517.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 1996;384(6607):360-364.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;95(1-2):1-8.
- Nicholson GM, Little MJ, Tyler M, Narahashi T. Selective alteration of sodium channel gating by Australian funnel-web spider toxins. *Toxicon* 1996;34(11-12):1443-1453.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):165-217.
- Norton RS. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 1991;29(9):1051-1084.
- Norton RS, Pallaghy PK. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 1998;36(11):1573-1583.
- Novakovic SD, Eglen RM, Hunter JC. Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system. *Trends Neurosci* 2001;24(8):473-478.
- Novakovic SD, Kassotakis LC, Oglesby IB, Smith JA, Eglen RM, Ford AP, Hunter JC. Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain* 1999;80(1-2):273-282.
- Nozaki-Taguchi N, Yaksh TL. Characterization of the antihyperalgesic action of a novel peripheral mu-opioid receptor agonist--loperamide. *Anesthesiology* 1999;90(1):225-234.
- Ohsawa M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Kampine JP, Tseng LF. Differential antinociception induced by spinally administered endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001a;298(2):592-597.
- Ohsawa M, Shiraki M, Mizoguchi H, Narita M, Kawai K, Nagase H, Cheng EY, Narita M, Tseng LF. Release of [Met5]enkephalin from the spinal cord by intraventricularly administered endomorphin-2, but not endomorphin-1 in the anesthetized rat. *Neuroscience letters* 2001b;316(1):1-4.

- Olausson H, Ha B, Duncan GH, Morin C, Ptito A, Ptito M, Marchand S, Bushnell MC. Cortical activation by tactile and painful stimuli in hemispherectomized patients. *Brain* 2001;124(Pt 5):916-927.
- Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *The New England journal of medicine* 2004;350(11):1104-1110.
- Olson TH, Riedl MS, Vulchanova L, Ortiz-Gonzalez XR, Elde R. An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport* 1998;9(6):1109-1113.
- Palecek J, Willis WD. The dorsal column pathway facilitates visceromotor responses to colorectal distention after colon inflammation in rats. *Pain* 2003;104(3):501-507.
- Panula P, Kalso E, Nieminen M, Kontinen VK, Brandt A, Pertovaara A. Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain research* 1999;848(1-2):191-196.
- Pasternak GW. Multiple opiate receptors: deja vu all over again. *Neuropharmacology* 2004;47 Suppl 1:312-323.
- Pasternak GW, Simantov R, Snyder SH. Characterization of and endogenous morphine-like factor(enkephalin) in mammalian brain. *Molecular pharmacology* 1976;12(3):504-513.
- Pasternak GW, Wood PJ. Multiple mu opiate receptors. *Life sciences* 1986;38(21):1889-1898.
- Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *Embo J* 1998;17(15):4283-4290.
- Paterlini MG, Avitabile F, Ostrowski BG, Ferguson DM, Portoghese PS. Stereochemical requirements for receptor recognition of the mu-opioid peptide endomorphin-1. *Biophys J* 2000;78(2):590-599.
- Paukert M, Babini E, Pusch M, Grunder S. Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *The Journal of general physiology* 2004;124(4):383-394.
- Pearl JN, Gross GJ. Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *American journal of physiology* 2003;285(1):H81-89.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002;108(5):705-715.
- Peloquin JB, Khosravani H, Barr W, Bladen C, Evans R, Mezeyova J, Parker D, Snutch TP, McRory JE, Zamponi GW. Functional analysis of Ca_v3.2 T-type calcium channel mutations linked to childhood absence epilepsy. *Epilepsia* 2006;47(3):655-658.
- Penn RD, Paice JA. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain* 2000;85(1-2):291-296.
- Perl ER. Getting a line on pain: is it mediated by dedicated pathways? *Nature neuroscience* 1998;1(3):177-178.
- Pernow B. Distribution of substance P in the central and peripheral nervous system. *Nature* 1953;171(4356):746.
- Pertovaara A, Kemppainen P. The influence of naloxone on dental pain threshold elevation produced by peripheral conditioning stimulation at high frequency. *Brain research* 1981;215(1-2):426-429.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Holtt V, Schulz S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(22):19762-19772.

- Pierce TL, Wessendorf MW. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 2000;18(4):181-207.
- Pignataro G, Simon RP, Xiong ZG. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* 2007;130(Pt 1):151-158.
- Pillay PK, Hassenbusch SJ. Bilateral MRI-guided stereotactic cingulotomy for intractable pain. *Stereotact Funct Neurosurg* 1992;59(1-4):33-38.
- Pirec V, Laurito CE, Lu Y, Yeomans DC. The combined effects of N-type calcium channel blockers and morphine on A delta versus C fiber mediated nociception. *Anesthesia and analgesia* 2001;92(1):239-243.
- Podlogar BL, Paterlini MG, Ferguson DM, Leo GC, Demeter DA, Brown FK, Reitz AB. Conformational analysis of the endogenous mu-opioid agonist endomorphin-1 using NMR spectroscopy and molecular modeling. *FEBS letters* 1998;439(1-2):13-20.
- Poet M, Tauc M, Lingueglia E, Cance P, Poujeol P, Lazdunski M, Counillon L. Exploration of the pore structure of a peptide-gated Na⁺ channel. *Embo J* 2001;20(20):5595-5602.
- Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, Eglen RM, Kassotakis L, Novakovic S, Rabert DK, Sangameswaran L, Hunter JC. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(14):7640-7644.
- Prasad M, Fearon IM, Zhang M, Laing M, Vollmer C, Nurse CA. Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. *J Physiol* 2001;537(Pt 3):667-677.
- Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, Stucky CL, Mannsfeldt AG, Brennan TJ, Drummond HA, Qiao J, Benson CJ, Tarr DE, Hrstka RF, Yang B, Williamson RA, Welsh MJ. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 2000;407(6807):1007-1011.
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 2001;32(6):1071-1083.
- Rainville P, Bushnell MC, Duncan GH. PET studies of the subjective experience of pain. In: KL Casey, MC Bushnell, editors|. *Book Title*|. Vol. Volume|. City|: Publisher|, Year|. p.^pp. Pages|.
- Rainville P, Duncan GH, Bushnell MC. Représentation cérébrale de l'expérience subjective de la douleur chez l'Homme. *Médecine & Science* 2000.
- Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science (New York, NY)* 1997;277(5328):968-971.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Analgesic drugs. In: HP Rang, MM Dale, JM Ritter, PK Moore, editors|. *Book Title*|. Vol. Volume|. City|: Publisher|, Year|. p.^pp. Pages|.
- Reeh PW, Steen KH. Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res* 1996;113:143-151.
- Reisine T. Opiate receptors. *Neuropharmacology* 1995;34(5):463-472.
- Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *Journal of neurophysiology* 2001;86(2):629-640.
- Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science (New York, NY)* 1969;164(878):444-445.
- Reznik M. [Structure and functions of the cutaneous nervous system]. *Pathol Biol (Paris)* 1996;44(10):831-837.

- Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol* 2001;60(6):404-415.
- Riviere PJ. Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br J Pharmacol* 2004;141(8):1331-1334.
- Rogawski MA. New Evidence Supporting a Role for T-Type Ca(2+) Channels in Absence Epilepsy and in the Action of Ethosuximide. *Epilepsy Curr* 2002;2(2):57.
- Rush AM, Brau ME, Elliott AA, Elliott JR. Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 1998;511 (Pt 3):771-789.
- Salinas M, Rash LD, Baron A, Lambeau G, Escoubas P, Lazdunski M. The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J Physiol* 2006;570(Pt 2):339-354.
- Salter MW, De Koninck Y, Henry JL. ATP-sensitive K⁺ channels mediate an IPSP in dorsal horn neurones elicited by sensory stimulation. *Synapse* 1992;11(3):214-220.
- Salter MW, Henry JL. Purine-induced depression of dorsal horn neurons in the cat spinal cord: enhancement by tachykinins. *Neuroscience* 1987;23(3):903-915.
- Sanchez-del-Rio M, Reuter U. Migraine aura: new information on underlying mechanisms. *Curr Opin Neurol* 2004;17(3):289-293.
- Sandner-Kiesling A, Li X, Eisenach JC. Morphine-induced spinal release of adenosine is reduced in neuropathic rats. *Anesthesiology* 2001;95(6):1455-1459.
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglen RM, Herman RC. Additions and Corrections to Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *The Journal of biological chemistry* 1996a;271(22):13292A-13292.
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglen RM, Herman RC. Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *The Journal of biological chemistry* 1996b;271(11):5953-5956.
- Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai V. Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia* 2000;20(10):907-918.
- Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, Alberti A, Maggioni F, Rossi C, Floridi A, Calabresi P. Clinical-biochemical correlates of migraine attacks in rizatriptan responders and non-responders. *Cephalalgia* 2006;26(3):257-265.
- Saugstad JA, Roberts JA, Dong J, Zeitouni S, Evans RJ. Analysis of the membrane topology of the acid-sensing ion channel 2a. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(53):55514-55519.
- Sawynok J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacological reviews* 2003;55(1):1-20.
- Sawynok J, Reid A, Nance D. Spinal antinociception by adenosine analogs and morphine after intrathecal administration of the neurotoxins capsaicin, 6-hydroxydopamine and 5,7-dihydroxytryptamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1991;258(1):370-380.
- Schild L, Schneeberger E, Gautschi I, Firsov D. Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *The Journal of general physiology* 1997;109(1):15-26.
- Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J Clin Neurophysiol* 2000;17(6):592-603.

- Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W. Complex blockade of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *Journal of neurophysiology* 1998;79(4):1746-1754.
- Schreff M, Schulz S, Wiborny D, Holtt V. Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport* 1998;9(6):1031-1034.
- Scott DA, Wright CE, Angus JA. Actions of intrathecal omega-conotoxins CVID, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in the rat. *European journal of pharmacology* 2002;451(3):279-286.
- Scroggs RS, Fox AP. Multiple Ca²⁺ currents elicited by action potential waveforms in acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 1992;12(5):1789-1801.
- Seward E, Hammond C, Henderson G. Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proceedings* 1991;244(1310):129-135.
- Seydel C. Neuroscience. How neurons know that it's c-c-c-c-cold outside. *Science* (New York, NY 2002;295(5559):1451-1452.
- Sheng S, Li J, McNulty KA, Avery D, Kleyman TR. Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(12):8572-8581.
- Sherrington CS. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol* 1906;34(1-2):1-50.
- Shin JB, Martinez-Salgado C, Heppenstall PA, Lewin GR. A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nature neuroscience* 2003;6(7):724-730.
- Siegelbaum SA, Camardo JS, Kandel ER. Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in Aplysia sensory neurones. *Nature* 1982;299(5882):413-417.
- Silva AP, Cavadas C, Grouzmann E. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta* 2002;326(1-2):3-25.
- Simantov R, Kuhar MJ, Pasternak GW, Snyder SH. The regional distribution of a morphine-like factors enkephalin in monkey brain. *Brain research* 1976;106(1):189-197.
- Simonnet G, Rivat C. Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport* 2003;14(1):1-7.
- Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999;83(3):389-400.
- Sjolund BH, Eriksson MB. The influence of naloxone on analgesia produced by peripheral conditioning stimulation. *Brain research* 1979;173(2):295-301.
- Skolnick MH, Wilson OB, Hamilton RF, Collard CD, Hudson-Howard L, Hymel C, Malin DH. Low current electrostimulation produces naloxone-reversible analgesia in rats. *Stereotact Funct Neurosurg* 1989;53(2):125-140.
- Sluka KA. Blockade of calcium channels can prevent the onset of secondary hyperalgesia and allodynia induced by intradermal injection of capsaicin in rats. *Pain* 1997;71(2):157-164.
- Sluka KA. Blockade of N- and P/Q-type calcium channels reduces the secondary heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;287(1):232-237.
- Sluka KA, Walsh D. Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. *J Pain* 2003;4(3):109-121.
- Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 1998;20(4):629-632.

- Snyder SH, Pasternak GW, Pert C. Opiate receptor mechanisms. In: LL Iversen, SD Iversen, SH Snyder, editors|. Book Title|, Vol. Volume|. City|: Publisher|, Year|. p.^pp. Pages|.
- Solomon RL. Recent experiments testing an opponent-process theory of acquired motivation. *Acta neurobiologiae experimentalis* 1980;40(1):271-289.
- Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebenuis-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* 2000;407(6807):1015-1017.
- Spinella M, Cooper ML, Bodnar RJ. Excitatory amino acid antagonists in the rostral ventromedial medulla inhibit mesencephalic morphine analgesia in rats. *Pain* 1996;64(3):545-552.
- Stahl KD, van Bever W, Janssen P, Simon EJ. Receptor affinity and pharmacological potency of a series of narcotic analgesic, anti-diarrheal and neuroleptic drugs. *European journal of pharmacology* 1977;46(3):199-205.
- Staud R, Robinson ME, Vierck CJ, Jr., Cannon RC, Mauderli AP, Price DD. Ratings of experimental pain and pain-related negative affect predict clinical pain in patients with fibromyalgia syndrome. *Pain* 2003;105(1-2):215-222.
- Steen KH, Issberner U, Reeh PW. Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation. *Neuroscience letters* 1995;199(1):29-32.
- Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neuroscience letters* 1993;154(1-2):113-116.
- Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* 1992;12(1):86-95.
- Stepien A, Jagustyn P, Trafny EA, Widerkiewicz K. [Suppressing effect of the serotonin 5HT1B/D receptor agonist rizatriptan on calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration in migraine attacks]. *Neurol Neurochir Pol* 2003;37(5):1013-1023.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112(6):819-829.
- Sugiura T, Dang K, Lamb K, Bielefeldt K, Gebhart GF. Acid-sensing properties in rat gastric sensory neurons from normal and ulcerated stomach. *J Neurosci* 2005;25(10):2617-2627.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *Journal of neurophysiology* 2002;88(1):544-548.
- Suh HH, Collins KA, Tseng LF. Intrathecal cholecystokinin octapeptide attenuates the antinociception and release of immunoreactive Met-enkephalin induced by intraventricular beta-endorphin in the rat. *Neuropeptides* 1992;21(3):131-137.
- Suh HH, Fujimoto JM, Tseng LL. Differential mechanisms mediating beta-endorphin- and morphine-induced analgesia in mice. *European journal of pharmacology* 1989;168(1):61-70.
- Surprenant A, Buell G, North RA. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* 1995;18(5):224-229.
- Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(2):711-716.

- Suzuki M, Sato J, Kutsuwada K, Ooki G, Imai M. Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(10):6330-6335.
- Suzuki R, Dickenson AH. Neuropathic pain: nerves bursting with excitement. *Neuroreport* 2000;11(12):R17-21.
- Swartz KJ, MacKinnon R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 1995;15(4):941-949.
- Szolcsanyi J, Nagy J, Petho G. Effect of CP-96,345 a non-peptide substance P antagonist, capsaicin, resiniferatoxin and ruthenium red on nociception. *Regul Pept* 1993;46(1-2):437-439.
- Takahashi Y, Hashimoto K, Tsuji S. Successful use of zonisamide for central poststroke pain. *J Pain* 2004;5(3):192-194.
- Talbot JD, Marrett S, Evans AC, Meyer E, Bushnell MC, Duncan GH. Multiple representations of pain in human cerebral cortex. *Science (New York, NY)* 1991;251(4999):1355-1358.
- Talbot JD, Villemure JG, Bushnell MC, Duncan GH. Evaluation of pain perception after anterior capsulotomy: a case report. *Somatosens Mot Res* 1995;12(2):115-126.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 2001;21(19):7491-7505.
- Tanabe M, Sakaue A, Takasu K, Honda M, Ono H. Centrally mediated antihyperalgesic and antiallodynic effects of zonisamide following partial nerve injury in the mouse. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005;372(2):107-114.
- Taylor BK, McCarson KE. Neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse dorsal horn increases with neuropathic pain. *J Pain* 2004;5(2):71-76.
- Tillement JP, Albengres E. [The pharmacologic basis of pain treatment]. *Therapie* 2001;56(6):687-696.
- Todorovic SM, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain research* 2002;951(2):336-340.
- Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 2004;61(1):3-12.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21(3):531-543.
- Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(12):6951-6956.
- Torebjork HE, Hallin RG. Identification of afferent C units in intact human skin nerves. *Brain research* 1974;67(3):387-403.
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, Fletcher C, Pietrobon D. Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca(2+) influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(20):13284-13289.
- Traub RJ. Spinal modulation of the induction of central sensitization. *Brain research* 1997;778(1):34-42.
- Triggle DJ. L-type calcium channels. *Curr Pharm Des* 2006;12(4):443-457.
- Tseng LF, Collins KA. Different mechanisms mediating tail-flick inhibition induced by beta-endorphin, DAMGO and morphine from ROb and GiA in anesthetized rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1991;257(1):530-538.

- Tseng LF, Narita M, Suganuma C, Mizoguchi H, Ohsawa M, Nagase H, Kampine JP. Differential antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2000;292(2):576-583.
- Tseng LF, Tang R. Different mechanisms mediate beta-endorphin- and morphine-induced inhibition of the tail-flick response in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1990;252(2):546-551.
- Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schifter S, Olesen J. No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol* 2005;58(4):561-568.
- Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, Kingman T, McCulloch J. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neuroscience letters* 1985;62(1):131-136.
- Ugawa S, Ueda T, Yamamura H, Shimada S. In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;136(1-2):125-133.
- Urban MO, Smith DJ. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1993;265(2):580-586.
- van Praag H, Frenk H. The role of glutamate in opiate descending inhibition of nociceptive spinal reflexes. *Brain research* 1990;524(1):101-105.
- Vance CL, Begg CM, Lee WL, Dubel SJ, Copeland TD, Sonnichsen FD, McEnery MW. N-type calcium channel/syntaxin/SNAP-25 complex probed by antibodies to II-III intracellular loop of the $\alpha 1B$ subunit. *Neuroscience* 1999;90(2):665-676.
- Vilim FS, Aarnisalo AA, Nieminen ML, Lintunen M, Karlstedt K, Kontinen VK, Kalso E, States B, Panula P, Ziff E. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Molecular pharmacology* 1999;55(5):804-811.
- Vitko I, Chen Y, Arias JM, Shen Y, Wu XR, Perez-Reyes E. Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel. *J Neurosci* 2005;25(19):4844-4855.
- Vogt BA, Sikes RW, Vogt LJ. Anterior cingulate cortex and the medial pain system. In: BA Vogt, M Gabriel, editors|. *Book Title*|. Vol. *Volume*|. City|: *Publisher*|. Year|. p.^pp. Pages|.
- Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 2001;21(20):8026-8033.
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *The European journal of neuroscience* 1998;10(11):3470-3478.
- Vyklicky L, Vlachova V, Vitaskova Z, Dittert I, Kabat M, Orkand RK. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol* 1999;517 (Pt 1):181-192.
- Wahl M, Schilling L, Parsons AA, Kaumann A. Involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and nitric oxide (NO) in the pial artery dilatation elicited by cortical spreading depression. *Brain research* 1994;637(1-2):204-210.
- Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *The Journal of biological chemistry* 1997a;272(34):20975-20978.

- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 1997b;386(6621):173-177.
- Waldmann R, Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8(3):418-424.
- Waldmann R, Voilley N, Mattei MG, Lazdunski M. The human degenerin MDEG, an amiloride-sensitive neuronal cation channel, is localized on chromosome 17q11.2-17q12 close to the microsatellite D17S798. *Genomics* 1996;37(2):269-270.
- Wall PD. Pain in the brain and lower parts of the anatomy. *Pain* 1995;62(3):389-393.
- Wang YX, Pettus M, Gao D, Phillips C, Scott Bowersox S. Effects of intrathecal administration of ziconotide, a selective neuronal N-type calcium channel blocker, on mechanical allodynia and heat hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Pain* 2000;84(2-3):151-158.
- Waxman SG. Channel, neuronal and clinical function in sodium channelopathies: from genotype to phenotype. *Nature neuroscience* 2007;10(4):405-409.
- Waxman SG, Dib-Hajj S. Erythralgia: molecular basis for an inherited pain syndrome. *Trends Mol Med* 2005;11(12):555-562.
- Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1995;1(7):658-660.
- Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, Jr., Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 2003;23(13):5496-5502.
- Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Yoder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH, Jr., Welsh MJ. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 2002;34(3):463-477.
- Wermeling DP. Ziconotide, an intrathecally administered N-type calcium channel antagonist for the treatment of chronic pain. *Pharmacotherapy* 2005;25(8):1084-1094.
- Willis WD. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 1985;308(1136):253-270.
- Willis WD, Jr. Role of the forebrain in nociception. *Prog Brain Res* 1991;87:1-12.
- Winterfield JR, Swartz KJ. A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels. *The Journal of general physiology* 2000;116(5):637-644.
- Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol* 2004;61(1):55-71.
- Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *The New England journal of medicine* 1994;331(25):1689-1692.
- Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(14):7723-7730.
- Woolf CJ, Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4(4):525-534.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science (New York, NY)* 2000;288(5472):1765-1769.
- Wright CE, Robertson AD, Whorlow SL, Angus JA. Cardiovascular and autonomic effects of omega-conotoxins MVIIA and CVID in conscious rabbits and isolated tissue assays. *Br J Pharmacol* 2000;131(7):1325-1336.

- Wright DE, Snider WD. Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *The Journal of comparative neurology* 1995;351(3):329-338.
- Wu LJ, Duan B, Mei YD, Gao J, Chen JG, Zhuo M, Xu L, Wu M, Xu TL. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(42):43716-43724.
- Xie J, Price MP, Berger AL, Welsh MJ. DRASIC contributes to pH-gated currents in large dorsal root ganglion sensory neurons by forming heteromultimeric channels. *Journal of neurophysiology* 2002;87(6):2835-2843.
- Xie J, Price MP, Wemmie JA, Askwith CC, Welsh MJ. ASIC3 and ASIC1 mediate FMRamide-related peptide enhancement of H⁺-gated currents in cultured dorsal root ganglion neurons. *Journal of neurophysiology* 2003;89(5):2459-2465.
- Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 2004;118(6):687-698.
- Xu W, Lipscombe D. Neuronal Ca(V)1.3 α (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 2001;21(16):5944-5951.
- Xu XJ, Colpaert F, Wiesenfeld-Hallin Z. Opioid hyperalgesia and tolerance versus 5-HT1A receptor-mediated inverse tolerance. *Trends in pharmacological sciences* 2003;24(12):634-639.
- Xu XJ, Puke MJ, Verge VM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hughes J, Hokfelt T. Up-regulation of cholecystokinin in primary sensory neurons is associated with morphine insensitivity in experimental neuropathic pain in the rat. *Neuroscience letters* 1993;152(1-2):129-132.
- Yamamoto T, Sakashita Y. Differential effects of intrathecally administered N- and P-type voltage-sensitive calcium channel blockers upon two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Brain research* 1998;794(2):329-332.
- Yang Y, Wang Y, Li S, Xu Z, Li H, Ma L, Fan J, Bu D, Liu B, Fan Z, Wu G, Jin J, Ding B, Zhu X, Shen Y. Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel α subunit, in patients with primary erythralgia. *Journal of medical genetics* 2004;41(3):171-174.
- Yao L, Fan P, Jiang Z, Mailliard WS, Gordon AS, Diamond I. Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(24):14379-14384.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(14):6736-6740.
- Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(17):6752-6757.
- Yokoyama CT, Sheng ZH, Catterall WA. Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci* 1997;17(18):6929-6938.
- Yoshimura M, Jessell T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol* 1990;430:315-335.
- Yoshimura N, Seki S, Novakovic SD, Tzoumaka E, Erickson VL, Erickson KA, Chancellor MB, de Groat WC. The involvement of the tetrodotoxin-resistant sodium channel

- Na(v)1.8 (PN3/SNS) in a rat model of visceral pain. *J Neurosci* 2001;21(21):8690-8696.
- Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience letters* 2001;311(2):137-141.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 1997;386(6624):499-502.
- Zamponi GW, McCleskey EW. Splicing it up: a variant of the N-type calcium channel specific for pain. *Neuron* 2004;41(1):3-4.
- Zanzouri M, Lauritzen I, Duprat F, Mazzuca M, Lesage F, Lazdunski M, Patel A. Membrane potential-regulated transcription of the resting K⁺ conductance TASK-3 via the calcineurin pathway. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(39):28910-28918.
- Zhang S, Tong Y, Tian M, Dehaven RN, Cortesburgos L, Mansson E, Simonin F, Kieffer B, Yu L. Dynorphin A as a potential endogenous ligand for four members of the opioid receptor gene family. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;286(1):136-141.
- Zhang YQ, Limbird LE. Hetero-oligomers of alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors do not lead to transactivation of G-proteins or altered endocytosis profiles. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 5):856-860.
- Zhong FX, Ji XQ, Tsou K. Intrathecal DSP4 selectively depletes spinal noradrenaline and attenuates morphine analgesia. *European journal of pharmacology* 1985;116(3):327-330.
- Zhu J, Jhamandas K, Yang HY. Release of neuropeptide FF (FLFQPQRF-NH₂) from rat spinal cord. *Brain research* 1992;592(1-2):326-332.

Résumé

Canaux ioniques, douleur et analgésie Effets analgésiques du blocage d'ASIC1a par la Psalmotoxine 1

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la douleur nous permet d'identifier les acteurs jouant des rôles majeurs et ainsi de définir précisément d'excellentes cibles thérapeutiques. Les canaux ioniques sont à l'origine de nos perceptions douloureuses, ils sont responsables du transport des messages nociceptifs et nous avons montré qu'ils pouvaient également moduler le message nociceptif *via* l'activation du système opioïdérique. Les canaux ioniques Asic Sensing Ion Channels (ASIC) sont directement impliqués dans les phénomènes de perception nociceptive de l'acidose tissulaire et de l'inflammation. Les sous-unités ASIC3 impliquées dans ces perceptions ne sont pas sensibles à la Psalmotoxine (PcTx1). En effet, PcTx1 est un bloqueur spécifique des canaux ASIC1a homomériques. Ces canaux ASIC1a sont exprimés dans le système nerveux central et notamment au niveau des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. L'injection de PcTx1 dans le liquide cébrospinal de souris et de rats induit une analgésie efficace dans différents modèles de douleurs thermique, mécanique, inflammatoire et neuropathique. L'analgésie induite par le blocage spécifique des canaux ASIC1a résulte de la stimulation des récepteurs opioïdériques μ et δ . Ces récepteurs sont activés par la Met-enképhaline qui est libérée massivement lors de l'inhibition des canaux ASIC1a. Bien que la Met-enképhaline relarguée induise une tolérance, elle ne produit pas de troubles locomoteurs comme le fait la morphine. Ainsi nous avons mis en évidence que le blocage d'ASIC1a dans le système nerveux central est responsable d'un relargage de Met-enképhaline qui en activant les récepteurs μ et δ provoque une analgésie puissante sans induire certains des effets indésirables de la morphine, une molécule analgésique de référence utilisée couramment en clinique.